



ELÍCIA TRINDADE ALVES

**ÓLEOS ESSENCIAIS E PELÍCULA À BASE DE
FÉCULA DE MANDIOCA NO CONTROLE DA
ANTRACNOSE EM MANGA**

LAVRAS-MG

2015

ELÍCIA TRINDADE ALVES

**ÓLEOS ESSENCIAIS E PELÍCULA À BASE DE FÉCULA DE
MANDIOCA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MANGA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

Orientador

Dr. Eduardo Alves

LAVRAS-MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Alves, Elícia Trindade.

Óleos essenciais e película à base de fécula de mandioca no
controle da antracnose em manga / Elícia Trindade Alves. – Lavras :
UFLA, 2015.

89 p. : il.

Dissertação(mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientador: Eduardo Alves.

Bibliografia.

1. Controle alternativo. 2. *Mangifera indica*. 3. *Colletotrichum*
sp.. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

ELÍCIA TRINDADE ALVES

**ÓLEOS ESSENCIAIS E PELÍCULA À BASE DE FÉCULA DE
MANDIOCA NO CONTROLE DA ANTRACNOSE EM MANGA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitopatologia, área de concentração em Fitopatologia, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 3 de Julho de 2015.

Dra. Leila Aparecida Salles Pio	UFLA
Dra. Ângelo Albérico Alvarenga	EPAMIG

Dr. Eduardo Alves
Orientador

LAVRAS - MG

2015

A Deus, pela vida e proteção. É d'Ele que vem minha força, fé e esperança de
todos os dias.

À minha mãe Alicéia, pelo amor, incentivo e esforços que me impulsionam a
seguir em frente.

Ao meu avô Antônio e a minha Avó Araci (*in memoriam*) fundamentais em
todos os passos da minha caminhada.

A todos os meus familiares e amigos, sempre ajudando, direta e indiretamente,
em busca dos meus sonhos.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro (projeto CNPq 303211/2013-0).

Aos professores do Departamento de Fitopatologia UFLA, pelos ensinamentos transmitidos.

Ao professor Eduardo Alves, pela orientação, paciência e ensinamentos de grande importância para a realização deste trabalho.

Às técnicas do Laboratório de Microscopia Eletrônica, Aline e Elisa, sempre dispostas a ajudar.

Aos Pós-doutores, Silvino e Leônidas, por todo apoio durante a execução deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Microscopia Eletrônica, pela harmoniosa convivência.

Aos estagiários do LME, bem como a todos os funcionários do DFP, por todo auxílio no desenvolvimento do trabalho.

Ao professor Ludwig e aos colegas Cláudia Almeida e Mateus, pelo auxílio na identificação filogenética do isolado utilizado.

Às amigas de UFLA Priscilla, Mírian, Marina e Jeanny presentes na minha caminhada desde a graduação, sempre me dando forças para continuar.

A todos os colegas da Pós-graduação e Graduação do Departamento de Fitopatologia.

RESUMO GERAL

A antracnose é considerada a principal doença pós-colheita de frutos de manga, o que é limitante à exportação e responsável por consideráveis perdas. A busca pelo controle dessa doença, por meio de métodos alternativos é constante, com isso, neste trabalho, objetivou-se avaliar o potencial da película à base de fécula de mandioca 2 e 3% associada ou não a cinco óleos essenciais na conservação pós-colheita de mangas e no controle de um isolado de antracnose *in vitro* e *in vivo*. O isolado obtido de mangas ‘Tommy Atkins’ foi identificado e incorporado à CML do DFP-UFLA. Os óleos essenciais de Palmarosa (*Cymbopogon martinii*), Cravo-da-índia (*Sisyrinchium aromaticum*), Tomilho (*Thymus vulgaris*), Canela (*Cinnamomum casia*) e Capim limão (*Cymbopogon citratus*) foram utilizados a 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ e obtidos da empresa Lazlo selecionados mediante potencial de inibição ao patógeno. Nos experimentos *in vitro*, foram avaliados os potenciais de inibição de germinação e de crescimento micelial da película combinada ou não aos óleos. No experimento *in vivo*, os mesmos tratamentos foram aplicados nos frutos após inoculação e estes avaliados diariamente, e, no oitavo dia retiradas amostras para MEV e epifluorescência. O óleo essencial de canela inibiu a germinação de conídios, assim como o fungicida utilizado, mostrando efeito protetor desse óleo. O óleo de cravo isoladamente ou associado à película 2 e 3%, assim como o óleo de tomilho e o fungicida reduziram o IVC. No experimento *in vivo*, todos os tratamentos contendo película isolada ou combinadas aos óleos utilizados tiveram redução no desenvolvimento das lesões (AACPD) causadas pelo fungo inoculado nos frutos avaliados por dois métodos, sendo a microscopia de fundamental importância na visualização dos resultados obtidos.

Palavras-chave: *Mangifera indica*. Biofilme. Controle alternativo. Microscopia. Pós- colheita.

GENERAL ABSTRACT

Anthracnose is the main postharvest disease for mango fruits. Limiting to exportation, it is responsible for considerable losses. The struggle to control this plant pathogen by means of alternative methods is constant. Therefore, this research had the objective of evaluating the potential of the film made of cassava starch at 2% and 3%, associated or not to five essential oils obtained from mango postharvest conservation, and the *in vitro* and *in vivo* control of an isolate. The isolate obtained from “Tommy Atkins” mango was identified and incorporated to the Mycological Collection of Lavras from the Department of Phytopathology of the Universidade Federal de Lavras (UFLA), in Lavras, Minas Gerais, Brazil. The essential oils obtained from *Cymbopogon martinii*, *Sizirgum aromaticum*, *Thymus vulgaris*, *Cinnamomum casia* e *Cymbopogon citratus* were used at 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ and were attained from Lazlo company, and selected according to their pathogen inhibition potential. In the *in vitro* experiments, we evaluated the germination inhibition potential and mycelia growth of the film, combined or not to the oils. In the *in vivo* experiment, the same treatments were applied to the fruits after the inoculation, evaluated daily until the eighth day, when samples were taken for Scanning Electron Microscopy and epifluorescence. Cinnamon essential oil and the fungicide used inhibited conidia germination, showing the protective effect of this oil. Clove oil, associated or not to the film at 2% and 3%, as well as thyme oil and the fungicide, reduced Mycelial Growth Velocity Index. In the *in vivo* experiments, all treatments with isolated film, associated or not to the essential oils, presented reduction of injury development (area under the disease progress curve) caused by the fungi inoculated to the fruits, evaluated by both methods. Microscopy has fundamental importance on the visualization of the results.

Keywords: *Mangifera indica*. Biofilm. Alternative control. Microscopy. Anthracnose.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore filogenética NJ construída pelo software Mega 3.1 a partir de sequências da região GAPDH do isolado de manga ETA01 (CML3247) e de diferentes isolados de <i>Colletotrichum</i> spp. com sequências do GenBank, utilizando o método Neighbor-Joining.....	48
Figura 2	Fotografia dos sintomas típicos de antracnose em manga ocasionados após inoculação.....	49
Figura 3	Photomicrografias de conídios de <i>Colletotrichum</i> germinados e não germinados após 12 horas em meio ágar-água com seus respectivos tratamentos.	52
Figura 4	Fotografias das placas de Petri dos respectivos tratamentos no último dia de avaliação do experimento <i>in vitro</i> de crescimento micelial.....	55
Figura 5	Fotografias dos frutos de manga inoculados e tratados no último dia avaliação do experimento.....	63
Figura 6	Fotografia da mesma lesão da mesma repetição do tratamento à base de película de fécula de mandioca 3% em datas posteriores à última avaliação do experimento	64
Figura 7	Eletromicrografias de varredura de fragmentos de mangas inoculadas com <i>Colletotrichum</i> sp. e seus respectivos tratamentos	66
Figura 8	Eletromicrografias de varredura de fragmentos de mangas com seus respectivos tratamentos.....	68
Figura 9	Micrografias de epifluorescência de conídios e micélio na superfície dos tecidos de manga do isolado utilizado evidenciando a fluorescência emitida.....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição do primer utilizado	32
Tabela 2	Óleos essenciais selecionados para o trabalho	33
Tabela 3	Porcentagem média de conídios germinados de <i>Colletotrichum</i> e seus respectivos tratamentos	50
Tabela 4	Médias de Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de <i>Colletotrichum</i> em milímetros por dia, calculado pela fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991) e seus respectivos tratamentos	54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 Área abaixo da curva de progresso da doença para antracnose em manga ‘Tommy Atkins’ sob diferentes tratamentos avaliados com paquímetro digital.....59
- Gráfico 2 Área abaixo da curva de progresso da doença para antracnose em manga ‘Tommy Atkins’ sob diferentes tratamentos avaliados com escala diagramática de Corkidi et al.(2006)60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Manga	15
2.2	Principais doenças que afetam a cultura	16
2.3	<i>Colletotrichum spp.</i> e a antracnose da manga.....	17
2.4	Métodos de controle da antracnose.....	21
2.5	Aplicação de revestimentos ou biofilmes em pós-colheita.....	23
2.6	Aplicação da Microscopia no estudo de fitodoenças	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1	Local.....	30
3.2	Obtenção do isolado, identificação morfológica de <i>Colletotrichum</i> sp. e incorporação à coleção micológica	30
3.3	Patogenicidade do isolado <i>Colletotrichum sp.</i>	32
3.4	Obtenção e seleção dos óleos essenciais	33
3.5	Obtenção do meio de cultura, do fungicida e da fécula de mandioca	33
3.6	Experimento <i>in vitro</i> de germinação de conídios	34
3.6.1	Preparo dos tratamentos.....	34
3.6.2	Preparo do inóculo, repicagem e incubação.....	35
3.6.3	Tratamentos	36
3.6.4	Avaliação	37
3.7	Experimento <i>in vitro</i> de crescimento micelial	38
3.7.1	Preparo dos tratamentos.....	38
3.7.2	Preparo do inóculo, repicagem e incubação.....	38
3.7.3	Tratamentos	38
3.7.4	Avaliação	39
3.8	Experimento <i>in vivo</i>	39
3.8.1	Obtenção e preparo dos frutos	40
3.8.2	Preparo do inóculo, inoculação dos frutos e incubação	40
3.8.3	Preparo dos géis para revestimento, incorporação dos óleos e demais tratamentos.....	41
3.8.4	Revestimento dos frutos	42
3.8.5	Tratamentos	42
3.8.6	Avaliação	44
3.9	Delineamento Experimental	44
3.10	Preparo das amostras provenientes das mangas para microscopia eletrônica de varredura (MEV)	45
3.11	Preparo das amostras provenientes das mangas para microscopia de epifluorescência	46

4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
4.1	Caracterização molecular do isolado de <i>Colletotrichum</i>	47
4.2	Teste de patogenicidade	48
4.3	Experimento <i>in vitro</i> para verificar o efeito dos óleos essenciais combinados ou não à película de fécula de mandioca na germinação de conídios	49
4.4	Experimento <i>in vitro</i> para verificar o efeito dos óleos essenciais combinados ou não à película de fécula de mandioca no crescimento micelial	53
4.5	Experimento <i>in vivo</i>	58
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
6	CONCLUSÕES	77
	REFERÊNCIAS	78

1 INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de produtos naturais como frutas e hortaliças é significativo no Brasil e no mundo e, cada vez mais, os consumidores exigem qualidade desses alimentos, principalmente, por meio da busca de produtos orgânicos (PIMENTEL et al., 2005). A produção desses alimentos, principalmente de frutas, possui alto valor agregado, quando comparada à produção convencional que utiliza agroquímicos para o controle de pragas e doenças.

Ainda com relação aos produtos orgânicos, a certificação é uma exigência em mercados internacionais que possuem leis específicas para controlar e fiscalizar a cadeia produtiva do país exportador, permitindo a rastreabilidade pelo consumidor (BRITTO, 2004), que busca, além disso, frutos de qualidade.

A produção mundial de frutas tropicais atinge cerca de 82 milhões de toneladas anualmente, de acordo com estimativas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE, 2012) e dentre as principais frutas tropicais consumidas encontra-se a manga (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2012). O Brasil tem elevado potencial para aumento da produção e exportação, já que possui condições climáticas favoráveis, durante todo o ano, para produção, principalmente no Nordeste do país sob manejo adequado (ALBUQUERQUE et al., 1999).

Na manga, a antracnose é considerada uma das principais causas de perda da produção em pós-colheita (ÁNGEL et al., 2006). O controle químico geralmente é realizado com produtos à base de thiabendazol (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2013) e apresenta bons resultados. Porém, é importante ressaltar que os resíduos dos agroquímicos podem afetar a

saúde humana, bem como ocasionar isolados resistentes, além de contaminação ambiental (STANGARLIN et al., 1999). O principal entrave no quesito exportação são as barreiras fitossanitárias e o uso indiscriminado de agroquímicos.

Diante do exposto, é necessário buscar métodos alternativos de controle de fitopatógenos como utilização de biopelículas, agentes biocontroladores antagonistas e óleos essenciais. Esses novos métodos de controle de fungos vêm mostrando excelentes resultados no controle do gênero *Colletotrichum*, verificados nos trabalhos de Bosquez-Molina et al. (2010), Maqbool et al. (2011) e Roswalka (2010) dentre tantos outros.

Portanto, neste trabalho, objetivou-se verificar a eficiência de óleos essenciais, associados ou não a película à base de fécula de mandioca *in vitro* e *in vivo* no controle alternativo pós- colheita da antracnose da manga.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Manga

A mangueira (*Mangifera indica* L.), pertencente à família *Anacardiaceae*, é uma frutífera originária da Ásia e encontrou no Brasil condições edafoclimáticas favoráveis ao seu desenvolvimento e produção de frutos. Estima-se que, no século XVIII, portugueses trouxeram a fruta do norte africano para a América do Sul. A fase atual do cultivo da frutífera é caracterizada pelo elevado nível tecnológico, como irrigação, indução floral e plantio de variedades melhoradas geneticamente (MANICA et al., 2001)

Para a produção adequada de frutos, o manejo cultural é intensivo, sendo a planta propagada, principalmente, por enxertia e exigindo tratamentos culturais como indução floral, podas, manejo adequado de solo e constante controle de pragas e doenças (KAVATI, 1996), bem como manejo pós-colheita onde se concentram elevados gastos.

A expansão da produção de manga no Brasil destaca-se pelos estados de São Paulo e alguns estados do Nordeste, principalmente, na região semiárida representada pelos estados do Piauí e Ceará, e também Vale do São Francisco que abrange Minas Gerais, Bahia, Sergipe, Pernambuco entre outros. Em 2009, a produção nacional alcançou 1,197 milhões de toneladas, sendo o Nordeste responsável por 73,4% e o Sudeste 24,8% (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2012).

A manga é uma fruta de grande valor econômico e social, visto que a maioria dos empregos oferecidos no setor direciona-se à colheita e pós-colheita. Segundo AGRICULTURAL (ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA, 2012), no ano de 2010, houve crescimento significativo no volume de exportações para 124.694 toneladas e maior parte da produção concentra-se em

pequenos produtores. As principais cultivares comercializadas são: Palmer, Haden e Tommy Atkins, possuem também elevada exportação (ÁNGEL et al., 2006). O fruto apresenta comportamento climatérico pós-colheita e o processo de maturação é caracterizado pela hidrólise do amido e consequente aumento de açúcares simples (SAUCEDO-VELOZ; TORRES; LAKSHMINARAYANA, 1977). A maturação ocorre rapidamente em temperatura ambiente, de 2 a 9 dias quando colhida em estágio adequado e, com o avanço do processo de maturação, ocorrem trocas hidrolíticas em alguns componentes da parede celular que reduzem a firmeza, que incluem degradação de substâncias pécticas como protopectinas e pectatos de cálcio (ZAHARAH et al., 2012), essas mudanças decorrentes do processo de maturação podem facilitar o ataque de patógenos.

Os problemas que acometem a cultura têm origem biótica e abiótica. Com relação aos fatores abióticos, o *chilling* é o mais importante, e de comum ocorrência, quando os frutos permanecem armazenados sob baixas temperaturas por longos períodos (WANG et al., 2008). Dentre os danos bióticos mais frequentes nos mercados finais, geralmente ocasionados por micro-organismos, cerca de 78% são referentes a antracnose (ÁNGEL et al., 2006).

2.2 Principais doenças que afetam a cultura

Existem inúmeros patógenos que afetam a produção de mangas. A ocorrência de algumas doenças, principalmente nos frutos, vem comprometendo a produção em todo país e, conseqüentemente, a exportação (MANICA et al., 2001). Nessa cultura, as doenças têm um importante papel na irregularidade produtiva dos pomares, bem como na qualidade final do fruto (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

Os principais fitopatógenos que acometem a mangueira são fungos e, dentre eles, *Ceratocystis fimbriata* Ell. Et Halst que ocasiona seca e ocorre

somente no Brasil com sintoma de estrias radiais escuras internamente ao tronco (PIZZA JUNIOR; RIBEIRO, 1996)

Também de importância significativa, *Oidium mangiferae* Bert. (*Erysiphe polygoni* D.C.) é de comum ocorrência nos pomares e pode causar sérios prejuízos nas fases de florescimento e frutificação (JUNQUEIRA et al., 2001).

A morte descendente da mangueira ou podridão do pedicelo é uma grave doença de comum ocorrência em áreas irrigadas do nordeste brasileiro, causada pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* (*Lasidiplodia theobromae*) (VERMA; SINNG, 1970) e verifica-se elevada colaboração deste nas perdas pós-colheita. A verrugose, doença de importância secundária, causada pelo fungo *Elsinoe mangiferae* (*Sphaceloma mangiferae*) e os danos causados limitam-se a uma camada corticosa à superfície externa dos frutos e das folhas (BIANCHINI; MARINGONI; CARNEIRO, 2005).

A má formação vegetativa e floral, segundo Lopes, Magalhães e Laranjeira (2005), é causada por *Fusarium* sp. O principal sintoma é o ‘embonecamento’ da inflorescência que não produz frutos.

Dentre todas as doenças descritas, a de maior importância é a antracnose, ocasionada por espécies de *Colletotrichum*.

2.3 *Colletotrichum* spp. e a antracnose da manga

O gênero *Colletotrichum* pertence à classe Ascomycetes, e família *Melanconiliaceae*. Apresenta ampla distribuição geográfica no mundo, causando, principalmente, doenças pós-colheita em frutos como: banana (*Musa* spp.), caju (*Anacardium occidentale* L.), manga (*Mangifera indica* L.), maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa* Deg.) e mamão (*Carica papaya* L.) (BENATO,

1999; PERES et al., 2002), e ocasionam sérios problemas em regiões tropicais e subtropicais.

O gênero *Colletotrichum* é notoriamente variável em relação à determinadas características, destacando-se a patogenicidade, demonstrada em diversos patossistemas (SERRA et al., 2011). Portanto, a ocorrência de populações de espécies de *Colletotrichum* com comportamento patogênico diferenciado pode determinar variações na expressão da doença (FREEMAN; KATAN; SHABI, 1998).

Relatado como espécie, o *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. e Sacc., forma anamórfica (assexuada) do fungo *Glomerella cingulata* (AGRIOS, 2005). Esse fungo apresenta grande variação quanto à morfologia e ao rDNA entre os isolados verificados, sendo considerado um complexo de espécies (PHOULIVONG et al., 2010), alvo de diversos trabalhos no quesito filogenia.

A identificação da espécie de *Colletotrichum* responsável por antracnose em frutíferas é fundamental para o desenvolvimento e implantação de métodos eficientes no controle da doença (SERRA et al., 2011) e sabe-se o quanto é difícil definir e delimitar as espécies, utilizando poucos caracteres, como tamanho e forma de conídios e tipos de apressórios, ou seja, caracteres morfoculturais (CANNON; BRIDGE; MONTE, 2000). Estes geralmente se sobrepõem, tendo ainda algumas espécies uma ampla gama de hospedeiros e, dentre esses hospedeiros, mais de uma espécie de *Colletotrichum* pode ser responsável pelo processo infeccioso (CROUCH et al., 2009) o que revela a importância de adoção de mais caracteres (MENEZES, 2006) como a análise molecular e filogenética que distingue espécies dentro de *Colletotrichum*, considerada a mais comum e relevante espécies em condições tropicais (CAI et al., 2009; HYDE et al., 2009). Embora a identificação seja confusa, em razão da alta variabilidade morfológica e genotípica, as espécies pertencentes ao

complexo *Colletotrichum* são apresentadas como agente causal da antracnose (WEIR; JOHNSTON; DAMM, 2012).

O patógeno, além de infectar frutos maduros, pode também infectar frutos imaturos pela penetração direta da cutícula (DICKMAN; ALVAREZ, 1983), que é quando a infecção inicia-se no campo e, por alguma condição fisiológica imposta pelo hospedeiro, o desenvolvimento do patógeno é inibido e a doença fica latente (PRUSKY, 1996), manifestando-se somente após a colheita quando o estágio de maturação da fruta é alcançado em condições ambientais favoráveis. A ocorrência e a manutenção do patógeno em quiescência sobre o hospedeiro ou dentro do mesmo indicam um equilíbrio dinâmico entre hospedeiro, patógeno e ambiente (JARVIS, 1994). O patógeno no estágio de quiescência mantém baixo nível de metabolismo, entretanto, pode ativar fatores de patogenicidade que resultam em parasitismo ativo nos tecidos do hospedeiro (PRUSKY, 1996).

Na infecção ativa ou não latente, a penetração se processa por meio de ferimentos que podem ser realizados durante as operações de colheita e armazenamento (BRUTON, 1994) e ocorre quando os frutos iniciaram ou completaram o processo de maturação, o que os tornam mais suscetíveis à invasão pelo patógeno que, em razão do decréscimo de compostos fenólicos e ao aumento da predisposição às injúrias mecânicas, tornam esse substrato disponível ao seu rápido desenvolvimento (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

O desenvolvimento do *Colletotrichum spp.* é favorecido por temperatura e umidade relativa elevada (AGRIOS, 2005). Produz conídios unicelulares, hialinos, cilíndricos, com terminações obtusas ou elipsóides e dimensões de 7-20 x 2,5-5µm que são liberados pelos conidióforos formados em acérvulos, com formação de setas (RESENDE; MARTINS, 2005). A sobrevivência do fungo ocorre em restos de cultura de onde os conídios são liberados e disseminados por

respingo das chuvas, vento, insetos e ferramentas (KIMATI et al., 2005; TAVARES; SOUZA, 2005).

Tais conídios, ao atingir o fruto, germinam na presença de água e, logo em seguida, produzem o apressório que adere à cutícula do fruto e penetra diretamente o tecido não lesionado do hospedeiro. A penetração do tecido é favorecida pela ação de enzimas pectinolíticas excretadas no tecido do hospedeiro e pela força mecânica exercida pelo apressório sobre o peg de penetração. Após a penetração, as hifas crescem muito rapidamente tanto de forma intercelular como intracelular e podem permanecer latentes por algum tempo antes das células começarem a entrar em colapso e ocasionar podridão. O micélio produz acérvulos abaixo da cutícula, que a rompem e liberam os conídios que causam mais infecções. A agressividade do fungo aumenta quando o fruto começa a amadurecer e, por consequência, os sintomas aparecem (AGRIOS, 2005).

Antracnose é uma das principais doenças que acomete a mangueira e ocorre em todas as partes da planta, de folhas a frutos. É encontrada em todas as áreas produtoras de frutos do mundo, portanto considerada cosmopolita (SUTTON, 1992) atacando diversos hospedeiros. O fungo pode sobreviver por longos períodos em ramos secos e frutos no solo, além de estar presente em ampla gama de hospedeiros silvestres ou plantas cultivadas. É tido como o principal problema na pós-colheita (JOHNSON; COATES, 1993). Porém, em razão do clima seco em algumas regiões semiáridas produtoras, os danos podem ser menos expressivos.

Os sintomas mais comuns, segundo Arauz (2000), são manchas marrons arredondadas ou irregulares de 1 a 10 mm de diâmetro, podendo coalescer nas folhas e frutos e causar rompimento de tecidos. Nas brotações e ramos novos, surgem lesões escuras e necróticas, que evoluem a seca dos ramos causando desfolha. Nas inflorescências, surgem pequenas manchas escuras e profundas

que provocam sua morte e na ráquis das flores formam-se lesões, que podem levar à queda dos frutos antes de sua maturação fisiológica. Os conídios tendem a depositar-se ao redor do pedicelo do fruto e depois são redistribuídos no fruto durante os períodos de chuva.

2.4 Métodos de controle da antracnose

Sabe-se que somente frutos de alta qualidade, livres de doenças, distúrbios fisiológicos e pragas podem conquistar a exportação. Esses países importadores possuem exigências específicas com relação a frutas frescas e são realizadas rigorosas restrições à entrada de frutos portadores de organismos exóticos, que possam representar riscos para a agricultura local (JUNQUEIRA et al., 2001). Outra limitação significativa diz respeito aos defensivos agrícolas utilizados na fase de produção e de pós-colheita, bem como de seus resíduos, e, cada vez mais, sua utilização é restringida (WISNIEWSKI et al., 2001) promovendo o uso de agentes naturais de controle, tanto no pomar quanto na pós-colheita.

O tratamento de pós-colheita mais utilizado compreende a aplicação de fungicidas protetores ou um banho dos frutos em água quente a 55 °C por 5 minutos, ou uma combinação de ambos, mas, nesse caso, a temperatura deve ser reduzida para 53-52 °C. O tratamento por imersão em banho frio de fungicida à base de tiabendazol é muito utilizado, mas é menos eficiente (SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS, 2013).

Nas últimas décadas, a exploração da atividade de compostos secundários tem se tornado uma alternativa no controle de fitopatógenos com potencial ecológico para substituir o emprego de produtos sintéticos, por meio da utilização de subprodutos de plantas medicinais como extrato bruto e óleo essencial, uma vez que apresentam, em sua composição, substâncias com

propriedades fungicidas e/ou fungitóxicas (MATOS, 1997), ou podem até ocasionar indução de resistência. Possuem, ainda, a vantagem de serem praticamente inofensivos ao homem e ao meio ambiente, de menores custos, facilmente disponíveis aos agricultores e, em alguns casos, podem inclusive superar os produtos sintéticos em sua ação antimicrobiana (STANGARLIN et al., 1999). Os modos de ação variam de acordo com o óleo utilizado e o patossistema em que foi aplicado, podem atuar na permeabilidade das membranas celulares dos micro-organismos ou, até mesmo, diretamente nas organelas, dentre outros.

Em razão da grande riqueza química das plantas medicinais que possuem diversos princípios ativos, estas se tornam fontes de moléculas que podem ser empregadas na defesa de plantas contra fitopatógenos (RODRIGUES et al., 2006). Óleos essenciais são, portanto, misturas complexas de substâncias orgânicas lipofílicas e voláteis, geralmente incolores ou ligeiramente amareladas, odoríferas e líquidas que podem ser obtidas de vegetais por diferentes métodos (BANDONI; CZEPAK, 2008; SIMÕES et al., 2007).

Óleos essenciais de *Cymbopogon* spp., *Coriandrum sativum* e *Lippia alba* foram reportados na inibição de *Colletotrichum gloeosporioides* em maracujá (ANARUMA et al., 2010). Combrinck, Regnier e Kamatou (2011) verificaram a eficiência *in vitro* de dezoito óleos essenciais em fungos típicos de pós-colheita de frutas *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Alternaria citrii*, *Botrytis cinerea* e *Penicillium digitatum*, sendo o óleo de tomilho considerado o mais eficaz, seguido pelo óleo de canela. De acordo com estudos de Cruz et al. (2010), a dosagem de 1000 µL do óleo de *Citrus sinensis* via fumigação em frutos de manga “Tommy Atkins” resultou em menor número de frutos com lesões de antracnose. Roswalka, Mio e Nakashima (2008) avaliaram a ação de extratos, óleos e decoctos sob *C. gloeosporioides* e *G. cingulata in vitro* e concluíram que o óleo essencial de cravo-da-índia inibiu

em 100% o crescimento de *G. cingulata* e *C. gloeosporioides*, sendo este último totalmente inibido pelo óleo essencial de capim-limão, sendo que alguns decoctos também proporcionaram boa inibição.

Ainda com relação ao controle de antracnose, as biopelículas baseadas em diversos componentes têm sido amplamente pesquisadas, associadas ou não aos óleos essenciais, serão abordadas no item seguinte.

2.5 Aplicação de revestimentos ou biofilmes em pós-colheita

Os recobrimentos e filmes comestíveis são elaborados à base de macromoléculas biológicas (biopolímeros) capazes de formar uma matriz contínua, homogênea e coesa (GUILBERT, 1986; KESTER; FENNEMA, 1986) compostos por proteínas, polissacarídeos, lipídeos ou resinas associados ou não a outros componentes. Chitarra e Chitarra (2005) também denominam esse tipo de embalagem especial como embalagem ativa ou embalagem inteligente, já que não possui função somente de proteger, mas interage com o produto e meio ambiente, conservando melhor suas qualidades e funções, aumentando a vida útil com segurança de utilização.

Segundo Gontard e Guilbert (1994), a matéria - prima a ser utilizada na formação desses filmes deve possuir propriedades organolépticas neutras para não afetar o produto final, bem como limitar as transferências, ou trocas, entre os alimentos e o meio ambiente.

A utilização de biofilmes está em relativo crescimento, em razão da preocupação relacionada ao meio ambiente, visto que causam menor impacto, tanto na sua produção quanto na sua degradação, além de apresentar nula ou baixa toxidez, adicionam sobrevida de prateleira ao produto, por meio de um possível controle das trocas gasosas e vapor d'água, que resulta em redução da perda de compostos voláteis responsáveis pelo "flavor" e também perda de

massa (CAMPOS; GERSCHENSON; FLORES, 2011). A formulação dessas biopelículas baseia-se na solubilização do agente primário em um solvente, podendo ou não conter aditivos (SANTOS; BATISTA; GRAVINA, 2011).

De acordo com Azeredo (2003), a utilização de películas comestíveis tem sido bastante explorada para revestimento de frutas e hortaliças frescas, visando a minimizar a perda de umidade e reduzir as taxas de respiração, além de conferir aparência brilhante e atraente.

Ribeiro et al. (2009) utilizaram diferentes revestimentos à base de dextrina em diferentes concentrações, combinada ou não ao óleo de girassol em mangas 'Tommy Atkins' e observaram que o uso de revestimentos reduziu a perda de massa das frutas, porém na concentração de 2% de dextrina, contendo óleo de girassol, houve atraso na maturação, observando-se limitação da perda de firmeza e da degradação de ácidos orgânicos, alteração de substâncias pécticas e preservação da aparência.

O uso de revestimento à base de quitosana também está sob foco da pesquisa. Zhu et al. (2008) utilizaram concentrações de 0,5, 1,0 e 2,0% de quitosana e demonstraram que a cobertura de frutos 'Tainong' a 2,0% foi a mais eficiente, não comprometendo o desenvolvimento dos frutos nos quesitos de qualidade da polpa e aspecto superficial. Também foi demonstrada redução na ocorrência de *C. gloeosporioides*, com redução de incidência e diâmetro da lesão quando comparado às demais concentrações da solução de quitosana após inoculação. Abd-ALLA e Haggag (2010) verificaram efeito positivo no revestimento de frutos, utilizando solução de quitosana e obtiveram redução significativa de crescimento e inibição de germinação de esporos a partir da concentração 0,6 g.L⁻¹ e na concentração 0,8 g.L⁻¹ houve inibição total de crescimento micelial e germinação de esporos.

Outros diversos tipos de revestimento são estudados, como: azeite, cera de abelha, amido e benzoato de sódio e, segundo parâmetros analisados por Bibi

e Baloch (2012) a cera de abelha apresenta grande potencial no quesito de qualidade e tempo de prateleira das cultivares de manga Langra e Samar Bahisht Chaunsa sob diferentes temperaturas de armazenamento.

A ANVISA (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015) denomina fécula de mandioca como produto amiláceo extraído das raízes, sem passar por processo de fermentação. No processo de formação da película, é realizada a hidratação da fécula de mandioca sob temperatura e, em seguida, ocorre a gelatinização das moléculas de amilose que, em razão da sua linearidade, tendem a se orientar paralelamente e o amido gelatinizado é capaz de formar filmes estáveis e flexíveis. Essa formulação é aplicada para a formação de uma fina camada envoltória, que é seguida por um tratamento de secagem (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

Na tentativa de promover a conservação pós-colheita, desde décadas passadas, diversos estudos têm sido conduzidos nesse âmbito, principalmente em frutíferas, como, por exemplo, Campos, Kwiatkowski e Clemente (2011) verificaram que a utilização de fécula de mandioca 2% associada ou não à quitosana em morangos orgânicos reduziu a perda de massa nos frutos, reduziu a quantidade de leveduras e de micro-organismos psicrotrófilos e melhorou a aparência na análise sensorial. Pereira et al. (2006), trabalhando com revestimentos comestíveis à base de fécula de mandioca em mamão ‘Formosa’, concluíram que a película a 1% e 3% prolongaram a vida útil pós-colheita de frutos de mamão por quatro dias, sem afetar a qualidade dos mesmos e esses tratamentos retardaram o amadurecimento dos frutos, cujas alterações de cor da casca, firmeza da polpa, SS e AT foram, significativamente, mais lentas que os frutos não tratados. Em outro estudo conduzido por Santos, Batista e Gravina (2011) em mangas ‘Tommy Atkins’, os autores concluíram que o uso de biofilmes de fécula de mandioca a 2% e amido de milho a 4% reduziram a perda de massa, mantiveram a firmeza e melhoraram o aspecto visual, permitindo um

maior tempo de armazenamento sem perda da qualidade dos frutos. Scanavaca Junior, Fonseca e Pereira (2007) avaliaram a vida útil pós- colheita de mangas ‘Surpresa’ após tratamento de 4 diferentes concentrações de fécula de mandioca e constataram que o tratamento com 3% reduziu a perda de água, melhorou o aspecto visual dos frutos e prolongou o tempo de prateleira para 12 dias, contra 7 dias da testemunha. A película à base de fécula de mandioca é verificada, portanto, como excelente opção na proteção de frutos.

Os biorevestimentos associados a óleos essenciais também são alvo de pesquisa. Maqbool et al. (2011) verificaram eficácia no revestimento de goma arábica associada ou não a diferentes concentrações de óleo essencial de capim-limão e canela *in vitro*, e *in vivo* em banana na inibição de *C.musae* e em mamão na inibição de *C. gloeosporioides*. Cruz et al. (2012) avaliaram o efeito do óleo de *Lippia sidoides* e de *Piper aduncum*, cera de carnaúba e dextrina para o controle da podridão peduncular (*Lasiodyplodia theobromae*) em manga cv. Kent, obtendo resultados promissores com ambos os óleos utilizados. Bosquez-Molina et al. (2010) avaliaram o efeito antimicrobiano de óleo essencial de tomilho e limão incorporados em goma de algaroba 10% contra *C. gloeosporioides* e *R. stolonifer* em mamão e concluíram que esses revestimentos levaram a uma redução da deterioração induzida por micro-organismos de 50 e 40%, respectivamente, comparado com a infecção de 100% observada com o não tratado. Oriani et al. (2014) verificaram que o óleo essencial de canela a 0,05% associado à película de fécula de mandioca 2 ou 3% em maçã fatiada apresentam alta atividade antimicrobiana e antioxidante. Roswalka (2010) verificou efeito positivo em frutos de goiaba, utilizando película à base de fécula de mandioca 2% associada ou não a óleos essenciais de canela, cravo-da-índia, palmarosa, capim - limão e tomilho em relação ao desenvolvimento de *C. gloeosporioides* latente ou inoculado, proporcionando aumento na vida pós-

colheita dos frutos. Os mesmos resultados foram obtidos por Oliveira (2013) em frutos de mamão, porém com película a 3%.

2.6 Aplicação da Microscopia no estudo de fitodoenças

A microscopia, de forma geral, tem contribuição extensa em muitas pesquisas, principalmente no quesito a elucidar a interação patógeno-hospedeiro, podendo auxiliar na compreensão dos métodos de controle empregados.

Para se visualizar processos de infecção e interação, os microscópios de luz (ML), eletrônico de transmissão (MET) e eletrônico de varredura (MEV) têm proporcionado inestimáveis contribuições (ALVES; LEITE; KITAJIMA, 2008). Esses equipamentos são importantes ferramentas para o entendimento dos processos relacionados ao desenvolvimento das doenças em plantas, ou seja, da adesão, germinação, penetração, colonização e reprodução dos patógenos, bem como das reações das plantas a esses agentes (PERINA, 2011). São verificados inúmeros trabalhos na literatura, em diversos patossistemas.

Pereira et al. (2005) verificaram a colonização de *Colletotrichum* spp. em frutos de café em diferentes estádios de maturação e, como resultado, observaram intensa colonização no tecido próximo à epiderme, colapso dos estômatos com aspecto lignificado e crescimento de hifas e conídios, respectivamente externa e internamente ao tecido lesionado. Pereira et al. (2009) estudaram os eventos de pré-penetração e penetração de *C. gloeosporioides* em hipocótilos de cafeeiros e a colonização natural de ramos e frutos provenientes de plantas com sintoma de mancha manteigosa, por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Estudos histopatológicos foram feitos por Lins, Abreu e Alves (2007), em que processos de infecção, colonização e reprodução de diferentes isolados

de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro foram acompanhadas pela microscopia eletrônica de varredura.

A capacidade que os agentes biocontroladores têm de colonizar superfícies feridas muito mais rápido que o patógeno, e a produção de uma matriz floculante, afetando a integridade das hifas do patógeno foram investigados por Capdeville et al. (2007), por meio de microscópio eletrônico de varredura, utilizando a levedura *Cryptococcus magnus* como antagonista do *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão.

Com relação à microscopia de fluorescência, difere da microscopia de luz pelo fato de utilizar luz emitida pelo objeto a ser visualizado (FOSTER, 1997). Para a observação de fluorescência em espécimes, várias técnicas podem ser empregadas, tais como o uso de fluoróforos ou fluorocromos, que consistem em moléculas que apresentam fluorescência; o uso de sondas fluorescentes, que consiste numa terminologia que se refere a um fluoróforo quando ligado a outra molécula; bem como o uso de materiais autofluorescentes. (PADDOCK, 1999).

O uso de corantes fluorescentes, também chamados de fluoróforos ou fluorocromos, constitui em ótima ferramenta para a aplicação em pesquisas e estudos dentro do contexto da interação planta – patógeno (LUCAS et al., 2011). Esses fluoróforos podem se ligar especificamente a compostos celulares como membranas, organelas, e ácidos nucleicos e possuem uma vantagem de serem compatíveis com os tipos de microscopia que utilizam o princípio da fluorescência. Kangatharalingam e Ferguson (1984) propuseram técnica de coloração de núcleo de fungos com o corante Hoeschst 33258 em baixa concentração e pH constante, que se mostrou eficaz para sinalizar fungos vivos por se ligar ao DNA e, posteriormente, Hua'na, Sivasithamparam e O'brien (1991) aprimoraram a técnica, que é válida para fungos fitopatogênicos. A Rodamina 123, ou Rhodamine, é um corante fluorescente facilmente sequestrado por mitocôndrias ativas de hifas dentro de poucos minutos

(JOHNSON; WALSH; CHEN, 1980), bem como outras organelas ricas em proteínas. Desse modo, Swift et al. (2001) utilizaram essa técnica para *Botrytis cinerea* e relataram que a fluorescência por Rhodamine 123 pode ser extinta pelo colapso do gradiente eletroquímico de membranas mitocondriais, após tratamento com o fungicida azoxistrobina que limita a respiração celular. O calcofluor White também é um fluorocromo utilizado nas técnicas de microscopia de fluorescência, liga-se à quitina da parede celular e é muito eficaz para evidenciar hifas mesmo em baixa concentração, cerca de 1,5 μmol (HICKEY et al., 2005). Roca et al. (2003) utilizaram calcofluor e rhodamine para descrever ciclo de vida citológico de diferentes estirpes de *Colletotrichum lindemuthianum* e também anastomose. De acordo com Oparka e Read (1994), o iodeto de propídeo é também muito útil para testar a viabilidade celular de fungos e é apenas absorvido por células mortas ou tiveram a sua membrana plasmática danificada, que assumem fluorescência vermelha no comprimento de onda adequado (HICKEY et al., 2005). Soares (2007) utilizou azul de anilina como sonda que possibilitou o estudo detalhado do processo infeccioso de *Colletotrichum lindemuthianum* por microscopia de fluorescência.

Em relação à ultraestrutura com MEV e fluorescência, não foi encontrado nenhum estudo específico com relação ao patossistema manga-*Colletotrichum* e seu possível controle alternativo, o que reforça a necessidade de aprimoramento de estudos visando a compreender a interação planta-patógeno e eficiência dos métodos de biocontrole.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Local

Os experimentos, preparo das amostras, as observações e o registro das imagens em microscopia eletrônica foram realizados no laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural (LME) do Departamento de Fitopatologia (DFP) da Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG

3.2 Obtenção do isolado, identificação morfológica de *Colletotrichum* sp. e incorporação à coleção micológica

O isolado de *Colletotrichum* sp. foi obtido a partir de lesões em frutos maduros de manga, adquiridos em supermercado local em Lavras – MG.

Pequenos pedaços de tecidos epidérmicos e subepidérmicos de frutos lesionados foram desinfestados com álcool, hipoclorito de sódio a 2% e lavados com água esterilizada por 3 vezes. Em seguida, foram transferidos para placas de Petri, contendo meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar), mantidos em BOD a 25 °C e fotoperíodo de 12 horas. Após o crescimento do fungo, foi efetuada a cultura monospórica.

A obtenção da cultura monospórica foi realizada, a partir do reisolamento do fungo. Foi feita uma suspensão de conídios e retirada de uma alíquota de 100µL com uma pipeta automática e depositada em placa de Petri de 9 cm com meio ágar-água, contendo 5 ‘glass beads’ (bolinhas de vidro) em condições assépticas. Sem movimento brusco, a placa foi agitada para que as ‘glass beads’ pudessem espalhar a suspensão de forma homogênea no meio. Após o descarte das ‘glass beads’, a placa com a suspensão do fungo foi acondicionada em incubadora com fotoperíodo de 12 horas a 25 °C até a

germinação dos esporos. Depois de 24 horas de incubação, foi feita transferência de apenas um esporo germinado da placa com meio ágar-água para uma placa com meio BDA com uma agulha histológica em um microscópio de luz.

Por meio de preparações em lâminas e observações ao microscópio de luz, o fungo *Colletotrichum* sp. foi identificado, baseando-se em suas características morfológicas.

Após a identificação, o isolado foi incorporado à Coleção Micológica do Departamento de Fitopatologia da UFLA, e recebeu o código CML3247.

Foi iniciada também a identificação molecular visando a identificar espécie a nível filogenético. A cultura monospórica do isolado foi denominada ETA01 e cultivada em Extrato de Malte 2% líquido por três dias. Para a extração do DNA, o micélio foi filtrado em gaze, lavado com água destilada estéril e submetido à extração do DNA genômico, utilizando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit® (Promega, Madison, EUA), de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração do DNA foi mensurada utilizando o NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA) e padronizada para 5 ng/μL quando o resultado da quantificação foi acima desse valor. A reação de PCR foi realizada utilizando-se o kit Promega GoTaq® Colorless Master Mix no termociclador My Cycler™ (Bio-Rad, Hercules, EUA) e o mesmo conjunto de primer foi utilizado para a reação de sequenciamento.

O par de primer utilizado na amplificação por PCR da região gênica GAPDH foi GDF e GDR, descrito na Tabela 1.

Tabela 1 Descrição do primer utilizado

Gene	Primer	Direção	Sequência (5'-3')
GAPDH	GDF	Foward	GCC GTC AAC GAC CCC TTC ATT GA
	GDR	Reverse	GGG TGG AGT CGT ACT TGA GCA TGT

Fonte: (TEMPLETON et al., 1992).

As condições de PCR para o gene GAPDH foram: desnaturação inicial a 94 °C, durante 4 minutos, seguido por 34 ciclos a 94 °C durante 45 segundos (desnaturação), 60 °C durante 45 segundos (anelamento), 72 °C durante 1 minuto (extensão inicial) e uma extensão final a 72 °C durante 10 minutos (PRIHASTUTI et al., 2009).

O produto de amplificação de PCR foi separado por meio da eletroforese em gel de agarose a 1,5% e fotografado sob luz ultravioleta (UV). O produto de PCR amplificado foi purificado com o kit Wizard® SV gel e PCR Clean-Up System (Promega), seguindo as instruções do fabricante. A amostra de DNA amplificada para a região GAPDH, foi enviada para a Macrogen Corporation nos Estados Unidos da América (EUA) para o sequenciamento.

Depois de obter as sequências, estas foram editadas em SeqAssem e construída uma árvore filogenética utilizando o método Neighbor-Joining no software MEGA 3.1 juntamente 29 sequências de referência depositadas no GenBank para comparação, sendo uma delas o outgroup.

3.3 Patogenicidade do isolado *Colletotrichum sp.*

Para verificar a patogenicidade do isolado, 3 mangas ‘Tommy Atkins’ previamente lavadas em água corrente e desinfestadas com hipoclorito de sódio a 2%, foram inoculadas com uma suspensão de 2×10^5 conídios.mL⁻¹ em áreas demarcadas com cinco ferimentos feitos com agulha de metal.

Em seguida, foram mantidos em câmara úmida por 48 horas a 25 ± 2 °C e logo retirados da câmara úmida, permanecendo em bancada por uma semana e confirmada a patogenicidade do isolado.

3.4 Obtenção e seleção dos óleos essenciais

Os óleos foram adquiridos diretamente com a empresa Laszlo Aromaterapia LTDA, situada em Belo Horizonte-MG.

Os óleos essenciais foram selecionados mediante potencial de inibição ao patógeno, observado em experimentos *in vitro* e *in vivo* em frutos de goiabeira descritos por Roswalka (2010) e em mamões por Oliveira (2013) (Tabela 2).

Tabela 2 Óleos essenciais selecionados para o trabalho

Nome científico	Nome comum
<i>Cymbopogon martinii</i>	Palmarosa
<i>Sizirgum aromaticum</i>	Cravo-da-Índia (folhas)
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomilho branco
<i>Cymbopogon citratus</i>	Capim-limão
<i>Cinnamomum casia</i>	Canela (casca)

Todos os óleos foram mantidos em vidro âmbar, protegidos da luz e sob refrigeração.

3.5 Obtenção do meio de cultura, do fungicida e da fécula de mandioca

O fungicida Tecto® SC, que tem como ingrediente ativo thiabendol recomendado para a cultura, foi adquirido em comércio local.

O meio de cultura utilizado para o experimento de germinação ágar-água da empresa Vetec foi previamente preparado e esterilizado.

O meio de cultura utilizado BDA comercial (batata-dextrose-ágar) da empresa Himedia, foi previamente preparado e esterilizado.

A fécula de mandioca pertencente ao tipo 1, da empresa Amafil, foi adquirida em comércio local.

3.6 Experimento *in vitro* de germinação de conídios

Experimento executado para verificar o efeito dos óleos essenciais combinados ou não à película de fécula de mandioca na germinação de conídios.

3.6.1 Preparo dos tratamentos

Os óleos correspondentes na concentração de $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$ (0,1%) foram diluídos em solução de leite em pó na concentração de 10g.L^{-1} . Essas soluções foram preparadas em tubos tipo Falcon de 50 mL, estéreis em câmara de fluxo laminar.

Em placas estéreis de 9 cm, 9 mL do meio ágar-água foi vertido e no estado fundente 1mL da solução de óleo essencial em leite em pó foi adicionado.

No tratamento controle negativo foi adicionado da mesma maneira no ágar-água o fungicida Tecto® SC, na concentração recomendada pelo fabricante de 4mL.L^{-1} para a utilização em pós-colheita de frutos de manga. O meio ágar-água foi utilizado como controle positivo.

Um tratamento com solução de leite em pó foi utilizado para verificar se há interferência na germinação. Para isso, foi então adicionada solução de leite em pó na concentração de 10g.L^{-1} em 9 mL do meio fundente ágar-água.

Nesses tratamentos sem película, a suspensão de conídios foi adicionada logo após solidificação do meio de cultura com respectivos tratamentos em câmara de fluxo laminar.

Nos tratamentos contendo película à base de fécula de mandioca, as suspensões de fécula a 2,0 e 3,0% (peso/volume) foram previamente preparadas, aquecidas até 90 °C, agitadas periodicamente, de 10 em 10 segundos, até a obtenção de géis sem grânulos e, em seguida, autoclavadas em tubos Falcon na quantidade designada a cada tratamento.

Os óleos correspondentes na concentração de 1000 $\mu\text{L.L}^{-1}$ (0,1%) foram adicionados ou não na solução de fécula de mandioca quando esta atingiu temperatura ambiente.

A camada de ágar-água já inoculada com a suspensão de conídios foi recoberta com 1 mL da solução de óleo essencial e fécula de mandioca (2% ou 3%) com seu respectivo tratamento e uniformizada com alça de Drigalsky. A formação de película ocorreu com o resfriamento das placas abertas em câmara de fluxo laminar.

3.6.2 Preparo do inóculo, repicagem e incubação

Foi feita suspensão de conídios, adicionando-se 10 mL de água destilada esterilizada em placa com esporulação visível do fungo crescido em BDA por 8 dias, seguido de raspagem das colônias com alça de Drigalski. Em seguida, a solução foi filtrada em gaze estéril, visando a separar micélio e conídios, e ajustada concentração de 2×10^5 conídios. mL^{-1} aferida em câmara de Neubauer.

100 μL da suspensão foram depositados sobre os meios de cultura. Com auxílio de alça de Drigalski, a suspensão foi uniformizada por cima dos meios de cultura. Nos tratamentos sem película, a suspensão de conídios foi adicionada logo que o meio estava solidificado e tratado. Vale ressaltar que, no caso do uso de película, a suspensão de conídios foi adicionada no ágar-água solidificado e, logo em seguida, adicionadas as películas com ou sem os óleos em temperatura ambiente para que não danificasse os conídios por meio do calor.

Posteriormente, as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Foram feitas três repetições de cada tratamento, sendo cada placa de Petri uma repetição. Estas foram distribuídas ao acaso nas prateleiras da BOD em delineamento inteiramente casualizado.

3.6.3 Tratamentos

Foram designados 20 tratamentos ao total:

- a) T1: Óleo essencial de Canela
- b) T2: Óleo essencial de Cravo
- c) T3: Óleo essencial de Tomilho
- d) T4: Óleo essencial de Capim Limão
- e) T5: Óleo essencial de Palmarosa
- f) T6: Fungicida Tecto (Controle negativo)
- g) T7: Solução de Leite em Pó
- h) T8: Ágar-água puro (Controle positivo)
- i) T9: Película à base de fécula de mandioca 2%
- j) T10: Película à base de fécula de mandioca 3%
- k) T11: Película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de Canela 0,1%
- l) T12: Película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de Cravo 0,1%
- m) T13: Película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de Tomilho 0,1%
- n) T14: Película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de Capim Limão 0,1%

- o) T15: Película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de Palmarosa 0,1%
- p) T16: Película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de Canela 0,1%
- q) T17: Película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de Cravo 0,1%
- r) T18: Película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de Tomilho 0,1%
- s) T19: Película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de Capim Limão 0,1%
- t) 20: Película à base de fécula de mandioca 3% associada ao óleo essencial de Palmarosa 0,1%.

3.6.4 Avaliação

Passadas 12 horas, período necessário para a germinação dos conídios, pré-determinado em testes anteriores, as placas foram retiradas da BOD, para avaliar-lhes a germinação.

Foram considerados conídios germinados aqueles que apresentaram tubo germinativo maior que dois terços do tamanho do conídio, e, contados em microscópio de luz em um mesmo campo visual 50 conídios germinados e não germinados em cada repetição, totalizando 150 conídios por tratamento.

Para ilustração dos resultados, foram feitas imagens diretamente do meio de cultura em microscópio invertido Axio Observer Z1 Zeiss.

Os dados foram analisados quanto às pressuposições da análise de variância. Em casos de conformidade com as pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância, utilizando-se o software "R", e a significância das interações verificadas pelo teste F no nível de 5% de probabilidade ($p=0,05$).

Quando significativo, os tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$).

3.7 Experimento *in vitro* de crescimento micelial

Experimento executado para verificar o efeito dos óleos essenciais combinados ou não à película de fécula de mandioca no crescimento micelial.

3.7.1 Preparo dos tratamentos

O preparo foi realizado conforme item 3.6.1, porém sem adição da suspensão de conídios.

3.7.2 Preparo do inóculo, repicagem e incubação

Após preparo das placas com seus respectivos tratamentos, cada uma foi inoculada com um disco de micélio de 5mm retirados de uma mesma colônia crescida por 8 dias em BOD a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Logo, as placas foram vedadas com filme plástico e incubadas em BOD a 25 ± 2 °C, sob fotoperíodo de 12 horas.

Foram feitas três repetições de cada tratamento, sendo cada placa de Petri correspondente a uma repetição. Essas foram distribuídas ao acaso nas prateleiras em delineamento inteiramente casualizado.

3.7.3 Tratamentos

Foram designados 20 tratamentos no total, igual ao item 3.6.3, somente o controle positivo (T8) foi alterado para BDA.

3.7.4 Avaliação

As placas foram retiradas da BOD, diariamente, no mesmo horário, para avaliar o crescimento micelial por meio de medição com paquímetro digital, nos dois eixos de diâmetro de cada colônia, até que atingissem as bordas nas placas de Petri em qualquer tratamento. O índice de velocidade de crescimento micelial (IVCM) foi calculado pela fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991) em que:

$$\text{IVCM} = S (D - D_a) / N$$

IVCM: índice de velocidade de crescimento micelial, D: diâmetro médio atual, D_a : diâmetro médio do dia anterior, S: somatório e N: número de dias após inoculação.

Os dados foram analisados quanto às pressuposições da análise de variância. Em casos de conformidade com as pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software "R", e a significância das interações verificadas pelo teste F no nível de 5% de probabilidade ($p=0,05$). Quando significativo, os tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$).

3.8 Experimento *in vivo*

Experimento executado com frutos de manga para verificar o efeito dos óleos essenciais combinados ou não à película de fécula de mandioca, baseado na metodologia de Roswalka (2010) e de Oliveira (2013).

3.8.1 Obtenção e preparo dos frutos

Os frutos foram adquiridos em supermercado local em Lavras-MG. A cultivar escolhida foi a ‘Tommy Atkins’ de fácil acesso no comércio da região.

Em seguida, os frutos sem sintomas de doenças e sem qualquer dano mecânico foram selecionados e submetidos à lavagem em água corrente com detergente, desinfestação em hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% durante 3 minutos, lavagem em água destilada e secagem em papel toalha.

3.8.2 Preparo do inóculo, inoculação dos frutos e incubação

Foi feita suspensão de conídios adicionando-se água destilada autoclavada em placa com esporulação visível do fungo crescido em BDA por 8 dias. Em seguida, filtrada em gaze estéril e ajustada concentração de 2×10^5 conídios. mL⁻¹ aferida em câmara de Neubauer.

As mangas em estágio 3 de maturação segundo EMEX (EMPACADORAS DE MANGO DE EXPORTACIÓN, 1998), já desinfestadas superficialmente, foram inoculadas fazendo-se cinco furos com agulha histológica de 1mm de diâmetro e 4mm de profundidade em 4 regiões distintas de cada fruto, em sua parte mediana.

Por meio de uma pipeta automática, foram depositadas 15µL da suspensão de inóculo na concentração de $2,0 \times 10^5$ conídios.mL⁻¹ de *Colletotrichum sp.* em uma das quatro regiões de cada fruto.

Após o processo, os frutos foram colocados em suportes e incubados em câmara úmida vedada por 48 horas.

Após incubação, as mangas foram retiradas das câmaras úmidas e acondicionadas sobre papel filtro em bancada, onde permaneceram em

temperatura ambiente (25 ± 2 °C) durante 12 horas, aproximadamente, para secagem.

3.8.3 Preparo dos géis para revestimento, incorporação dos óleos e demais tratamentos

Suspensões de fécula de mandioca a 2% e 3% (peso/volume) em água destilada acondicionadas em béqueres foram aquecidas em forno de micro-ondas a 90 °C, agitadas, periodicamente, de 10 em 10 segundos, para a obtenção de géis sem grânulos.

Os óleos selecionados foram incorporados ao gel, individualmente, com e pipeta automática após resfriamento do mesmo, à temperatura ambiente (~ 25 °C) na concentração de 0,1% ($1000 \mu\text{L.L}^{-1}$).

Nos demais tratamentos sem a película de fécula de mandioca, foi adicionado 0,1mL de óleo essencial em cada litro de solução de leite em pó comercial na concentração de 10g.L^{-1} . Os óleos foram utilizados na mesma concentração de $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$.

No tratamento correspondente ao leite em pó, foi utilizada a mesma concentração da solução de 10g.L^{-1} , para verificar se há alguma interferência desse agente dispersante no controle da doença. Como controle positivo, foi utilizada água destilada.

No tratamento correspondente ao fungicida, a calda foi preparada conforme recomendação do fabricante de 4mL.L^{-1} de Tecto® SC em água destilada, concentração utilizada em pós- colheita de frutos de manga.

3.8.4 Revestimento dos frutos

Para o revestimento dos frutos, foi utilizada a técnica de imersão, sendo estabelecido como procedimento a imersão durante 1 minuto no respectivo tratamento, a retirada do excesso (escorrimento) e a secagem por 15 minutos, repetidas 3 vezes.

Nos demais tratamentos sem película foi feita imersão na solução correspondente.

Os frutos tratados permaneceram em suportes identificados com seus respectivos tratamentos em bancada do laboratório sob condições ambientes, visando a simular as condições de comercialização, no período de 8 dias.

3.8.5 Tratamentos

- a) T1: Frutos tratados somente com fungicida (controle negativo);
- b) T2: Frutos tratados somente com água destilada (controle positivo);
- c) T3: Frutos tratados somente com solução de leite em pó 10 g.L^{-1} ;
- d) T4: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (2,0%);
- e) T5: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (3,0%);
- f) T6: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (2,0%), com incorporação de canela a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- g) T7: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (2,0%), com incorporação de cravo-da-índia a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- h) T8: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (2,0%), com incorporação de tomilho a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$

- i) T9: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (2,0%), com incorporação de capim-limão a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- j) T10: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (2,0%), com incorporação de palmarosa a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- k) T11: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (3,0%), com incorporação de canela a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- l) T12: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (3,0%), com incorporação de cravo-da-índia a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- m) T13: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (3,0%), com incorporação de tomilho a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- n) T14: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (3,0%), com incorporação de capim-limão a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- o) T15: Frutos revestidos com película à base de fécula de mandioca (3,0%), com incorporação de palmarosa a $1000 \mu\text{L.L}^{-1}$
- p) T16: Frutos sem revestimento, somente óleo essencial de canela $1000 \mu\text{L. L}^{-1}$
- q) T17: Frutos sem revestimento, somente óleo essencial de cravo-da-índia $1000 \mu\text{L. L}^{-1}$
- r) T18: Frutos sem revestimento, somente óleo essencial de tomilho $1000 \mu\text{L. L}^{-1}$
- s) T19: Frutos sem revestimento, somente óleo essencial de capim-limão $1000 \mu\text{L. L}^{-1}$
- t) T20: Frutos sem revestimento, somente óleo essencial de palmarosa $1000 \mu\text{L. L}^{-1}$

3.8.6 Avaliação

Foram utilizados dois métodos de avaliação. No primeiro, as lesões provenientes da inoculação foram mensuradas diariamente com auxílio de paquímetro digital no sentido de comprimento e largura, inclusive antes do tratamento dos frutos, visto que já apresentavam lesões de tamanho significativo, em decorrência do período de incubação.

Também foi utilizada para avaliação de severidade, escala diagramática proposta por Corkidi et al. (2006), e atribuídas, diariamente, notas de um a seis em cada uma das quatro faces inoculadas de cada repetição. Posteriormente, as notas foram convertidas em porcentagem de área lesionada.

Os dados das duas metodologias de avaliação foram convertidos em AACPD, conforme proposto por Shaner e Finney (1977). Em seguida, foram analisados quanto às pressuposições da análise de variância. Em casos de conformidade com as pressuposições, os dados foram submetidos à análise de variância utilizando-se o software "R" (R Development Core Team, 2010), e a significância das interações verificadas pelo teste F no nível de 5% de probabilidade ($p=0,05$). Quando significativo, os tratamentos foram comparados pelo teste de Scott-Knott ($p=0,05$).

Foi obtida também a estimativa de correlação de Pearson para avaliar o grau de correlação entre os dois métodos de avaliação utilizados.

3.9 Delineamento Experimental

O experimento *in vivo* foi realizado utilizando delineamento inteiramente casualizado, no qual cada fruto corresponde a um tratamento e, em cada fruto, serão feitas 4 lesões em pontos distintos. Cada fruto corresponde a 1 repetição. Logo após o tratamento, os frutos identificados foram dispostos

aleatoriamente. Totalizaram-se 20 tratamentos com 3 repetições, perfazendo um total de 60 mangas.

Nos experimentos *in vitro*, o delineamento utilizado foi inteiramente casualizado. As placas com seus respectivos tratamentos foram numeradas e distribuídas ao acaso na BOD. Cada placa constitui uma repetição. Foram utilizados 20 tratamentos com 3 repetições, totalizando 60 placas no experimento de germinação e 60 placas no experimento de crescimento micelial.

3.10 Preparo das amostras provenientes das mangas para microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para a realização da microscopia eletrônica de varredura, amostras de pequenos fragmentos dos frutos foram coletados no último dia de avaliação e fixadas, seguindo a metodologia de Alves (2005).

Após fixação em Karnovsky modificado, as amostras foram submetidas a glicerol 30% por meia hora, em seguida criofaturadas em nitrogênio líquido. Por conseguinte, foi realizada pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 2%, a desidratação em série crescente de acetona nas concentrações de 25%, 50%, 75%, 90% e 100% e ao processo de secagem em aparelho de ponto crítico BAL-TEC CPD 030. Os espécimes obtidos foram fixados com fita dupla-face de carbono em suportes metálicos (stubs de alumínio) revestidos com papel alumínio, submetidos ao processo de metalização (sputtering) em ouro (banho de ouro), em aparelho BAL-TEC 050 e armazenados em dessecador contendo sílica gel. A observação das amostras e o registro das imagens foram realizados em microscópio eletrônico de varredura LEO Evo 40 XVP.

3.11 Preparo das amostras provenientes das mangas para microscopia de epifluorescência

Fragmentos dos frutos lesionados foram coletados também no último dia de avaliação e fixados em tampão PBS (NaCl 137 mM, Fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, pH de 7.4.) juntamente à 1% de glutaraldeído e 1% de paraformaldeído. Posteriormente, os materiais foram retirados da solução tamponante e tratados com 100 μ L dos seguintes corantes em tubos eppendorf envolvidos com papel alumínio:

- a) Calcoflúor 0,1%: Amostras permaneceram overnight neste fluorocromo em ambiente escuro com temperatura 22 °C;
- b) Rhodamina 1 μ molar: As amostras permaneceram por duas horas nas mesmas condições acima.

Em seguida, os fragmentos foram colocados em lamínulas e a visualização realizada após os respectivos períodos de incubação em microscópio invertido de epifluorescência Axio Observer Z.1 Zeiss com câmera acoplada, para obtenção das micrografias através do software Axio Vision.

Os filtros foram escolhidos de acordo com os fluorocromos utilizados, visto que cada um emite fluorescência em um respectivo comprimento de onda:

- a) Blue works (faixa do azul): Filter Set 49 BP G365 FT 395 BP 445/50;
- b) Red works (faixa do vermelho): Filter Set Chroma 39004 AT 605/55m EM 779/629

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização molecular do isolado de *Colletotrichum*

O resultado obtido constatou que o isolado utilizado neste trabalho ETA01 (CML3247) pertence ao complexo *C. gloeosporioides*, já que houve agrupamento desse isolado no ramo junto aos outros pertencentes a esse complexo com relação à região GADPH analisada. O isolado ETA 01 (CML3247) agrupou no mesmo ramo de *C. asianum*, portanto pertencem à mesma espécie filogenética (Figura 1). Esse resultado também foi encontrado por outros autores, entre eles Weir, Johnston e Damm (2012), que utilizaram vários genes na identificação filogenética de isolados de diversas culturas de diversos países e constataram que os isolados de manga provenientes da Tailândia, Filipinas e Japão pertencem à espécie *C. asianum*, já que agruparam em um mesmo clado. Neste trabalho, também descrevem-se características morfológicas da espécie, como comprimento e largura dos conídios e características morfoculturais que são pertinentes com as características observadas no presente isolado. Lima et al. (2013) foram os primeiros a relatar a existência de *C. asianum* no Brasil provenientes de frutos de manga, sendo essa espécie filogenética a segunda com maior frequência dentre os isolados utilizados pelos autores. As descrições morfológicas verificadas no isolado em questão também são pertinentes com as características descritas pelos autores, no qual os conídios apresentam forma cilíndrica, com comprimento médio de $13,4 \pm 2,36 \mu\text{m}$ e largura média de $4,31 \pm 0,61 \mu\text{m}$. Os autores evidenciam outras espécies filogenéticas também provenientes de frutos de manga, como *C. fructicola*, *C. tropicale*, *C. dianesei* e *Colletotrichum karstii*.

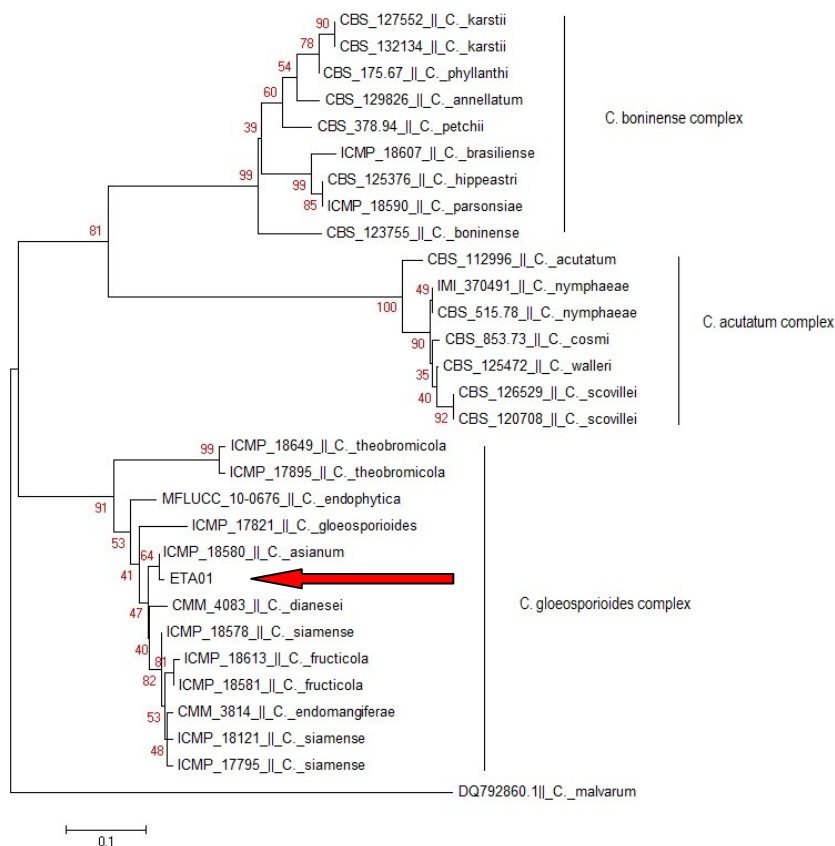


Figura 1 Árvore filogenética NJ construída pelo software Mega 3.1 a partir de sequências da região GAPDH do isolado de manga ETA01 (CML3247) e de diferentes isolados de *Colletotrichum* spp. com sequências do GenBank, utilizando o método Neighbor-Joining

Legenda: A sequência do isolado *C. Malvarum* obtida no GenBank foram utilizadas como outgroup. Uma análise de bootstrap foi feita com 10.000 repetições.

4.2 Teste de patogenicidade

O isolado utilizado nos experimentos foi patogênico nos três frutos inoculados, obtendo-se 100% de incidência de antracnose, ocasionando sintomas típicos descritos por Arauz (2000) (Figura 2).



Figura 2 Fotografia dos sintomas típicos de antracnose em manga ocasionados após inoculação

4.3 Experimento *in vitro* para verificar o efeito dos óleos essenciais combinados ou não à película de fécula de mandioca na germinação de conídios

Os dados atenderam a duas das três suposições da ANAVA, possuem normalidade e independência dos resíduos. O coeficiente de variação foi de 5,63%. Houve diferença significativa entre os tratamentos, conforme o teste de médias das percentagens de germinação de conídios (Tabela 3).

Tabela 3 Porcentagem média de conídios germinados de *Colletotrichum* e seus respectivos tratamentos

TRATAMENTOS	MÉDIAS (% Conídios germinados)
Capim- Limão+ Película 3%	99,33 a
Leite em pó	99,33 a
Capim- Limão + Película 2%	99 a
Película 3%	98 a
Película 2%	98 a
Palmarosa+ Película 3%	96,67 a
Palmarosa+ Película 2%	95,33 a
Ágar-água (Controle positivo)	94 a
Tomilho	92,67 b
Cravo + Película 3%	91,33 b
Palmarosa	91,33 b
Tomilho+ Película 2%	91 b
Tomilho+ Película 3%	91 b
Cravo + Película 2%	88,67 b
Capim- limão	87,33 b
Cravo	80,67 c
Canela+ Película 3%	57,33 d
Canela+ Película 2%	4,67 e
Canela	0,67 e
Tecto (Controle negativo)	0 e

Médias seguidas pela mesma letra, pertencem a um mesmo grupo, pelo teste Scott-Knot à 5% de probabilidade.

As menores percentagens de germinação de conídios foram encontradas nos tratamentos contendo o óleo essencial de canela com 0,67% de germinação, o fungicida Tecto SC®, que inibiu completamente a germinação e o óleo essencial de canela combinado à película 2% de fécula de mandioca com 4,67% de germinação.

As maiores percentagens de germinação de conídios foram encontradas nos tratamentos contendo leite em pó, ágar-água, película à base de fécula de mandioca 2%, película à base de fécula de mandioca 3%, óleo essencial de

capim-limão combinado à película 2%, óleo essencial de palmarosa combinado à película 2%, óleo essencial de capim-limão combinado à película 3%, óleo essencial de palmarosa combinado à película 3% (Tabela 3).

O leite em pó, que foi utilizado visando à solubilização dos óleos essenciais, provavelmente estimulou a germinação dos conídios, visto que a porcentagem de germinação 99,33% foi ligeiramente maior que do tratamento controle ágar-água com 94% de germinação embora sem diferença estatística. Segundo Perfect et al. (1999) os conídios nos acérvulos são protegidos por uma camada mucilaginosa com função de proteger contra dessecação e aumentar a eficiência da germinação. Os leites em pó contêm lecitina, um emulsificante natural, de acordo com Zuidam e Nedovic (2009). É frequentemente utilizado em experimentos com óleos essenciais visando a facilitar sua dispersão em água, e, em decorrência dessa propriedade emulsificante, pode ter removido a mucilagem dos conídios, favorecendo a germinação.

Na figura 3, é possível observar conídios não germinados no tratamento contendo óleo essencial de canela (Figura 3-A) e no tratamento contendo o fungicida Tecto SC (Figura 3-C). Na figura 3-B, é possível visualizar um conídio germinado no tratamento contendo óleo essencial de capim-limão, assim como os demais óleos que não obtiveram resultados satisfatórios.

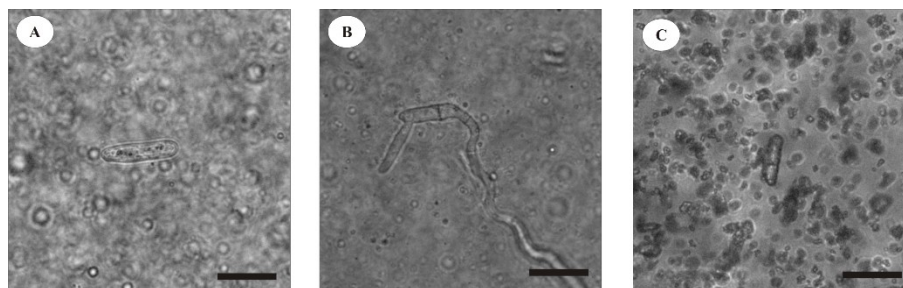


Figura 3 Photomicrografias de conídios de *Colletotrichum* germinados e não germinados após 12 horas em meio ágar-água com seus respectivos tratamentos

Legenda: A. Conídio não germinado em meio ágar-água contendo óleo essencial de canela; B. Conídio germinado em meio ágar-água contendo óleo essencial de capim-limão; C. *Conidio* não germinado em meio ágar-água contendo fungicida Tecto SC. Barras correspondem a 20 μ m.

O fungicida utilizado pertence ao grupo químico dos benzimidazóis, tem como ingrediente ativo o thiabendazol que atua na biossíntese da tubulina no núcleo celular, e quando a tubulina sofre alguma interferência o processo de divisão celular não decorre normalmente, o que pode ter controlado a germinação nas condições avaliadas.

Verifica-se que somente a película à base de fécula de mandioca não foi capaz de impedir a germinação de conídios, provavelmente, em razão da sua composição, rica em carboidratos, a germinação foi estimulada.

Nesse experimento, portanto, foi possível verificar eficiente controle da germinação pelo óleo essencial de canela, que vem sendo testado em diversos patossistemas conforme literatura. Esse óleo possui como constituinte majoritário o aldeído cinâmico ou cinamaldeído, superior à 80%, responsável por sua atividade antifúngica relatada por diversos autores. Gupta et al. (2008) afirmam que esse composto interfere em processos biológicos que envolvem a transferência de elétrons e reage com compostos contendo nitrogênio (por exemplo, proteínas e ácido nucléico.) e, assim, inibe o crescimento de micro-

organismos. Inclusive Lopes et al. (2014) utilizando essa substância isolada em filmes de base celulósica, reportaram controle eficiente dos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Fusarium oxysporum* e *Aspergillus flavus*, portanto pode-se atribuir à essa substância o controle exercido pelo óleo essencial de canela. Esse óleo, neste caso de germinação, pode ser considerado um fungicida protetor, visto que estes possuem função de prevenir a penetração dos fungos, por meio do controle da germinação e da emissão do tubo germinativo.

4.4 Experimento *in vitro* para verificar o efeito dos óleos essenciais combinados ou não à película de fécula de mandioca no crescimento micelial

Os dados atenderam às três suposições da ANAVA, possuem normalidade, homogeneidade da variância e independência dos resíduos. Houve diferença significativa conforme o teste de médias nos índices de velocidade de crescimento micelial calculados. O coeficiente de variação foi calculado em 9,36%.

Os tratamentos que obtiveram melhor controle do crescimento micelial, ou velocidade de crescimento reduzida, e não diferiram estatisticamente entre si foram o óleo essencial de cravo associado à película 2% com 5,2 mm.dia⁻¹, o óleo essencial de cravo com 7,17 mm.dia⁻¹, o fungicida Tecto SC 7,17 mm.dia⁻¹, o óleo essencial de tomilho com 8,02 mm.dia⁻¹ e o óleo essencial de cravo associado à película 3% com 8,21 mm.dia⁻¹ conforme tabela 4.

Tabela 4 Médias de Índice de Velocidade de Crescimento Micelial (IVCM) de *Colletotrichum* em milímetros por dia, calculado pela fórmula de Maguire (1962), adaptada por Oliveira (1991) e seus respectivos tratamentos

TRATAMENTOS	MÉDIAS DE IVCM (mm.dia ⁻¹)
Leite em pó	22,65 a
Capim- limão + película 3%	21,2 a
Palmarosa+ Película 3%	20,91 a
Palmarosa+ Película 2%	20,32 a
Capim- limão+ Película 2%	20,19 a
Película 2%	19,93 a
BDA (Controle positivo)	19,92 a
Capim- Limão	19,32 a
Película 3%	19,26 a
Canela+ Película 2%	18,72 b
Canela+ Película 3%	18,63 b
Palmarosa	18,24 b
Canela	17,92 b
Tomilho+ Película 3%	17,55 b
Tomilho+ Película 2%	14,14 c
Cravo+ Película 3%	8,21 d
Tomilho	8,02 d
Cravo	7,17 d
Tecto (Controle negativo)	7,17 d
Cravo+ Película 2%	5,2 d

Médias seguidas pela mesma letra, pertencem a um mesmo grupo, pelo teste Scott-Knot à 5% de probabilidade.

Na figura 4, é possível visualizar a diferença existente no crescimento micelial entre os tratamentos, no último dia de avaliação do experimento, comprovando os resultados da tabela anterior.

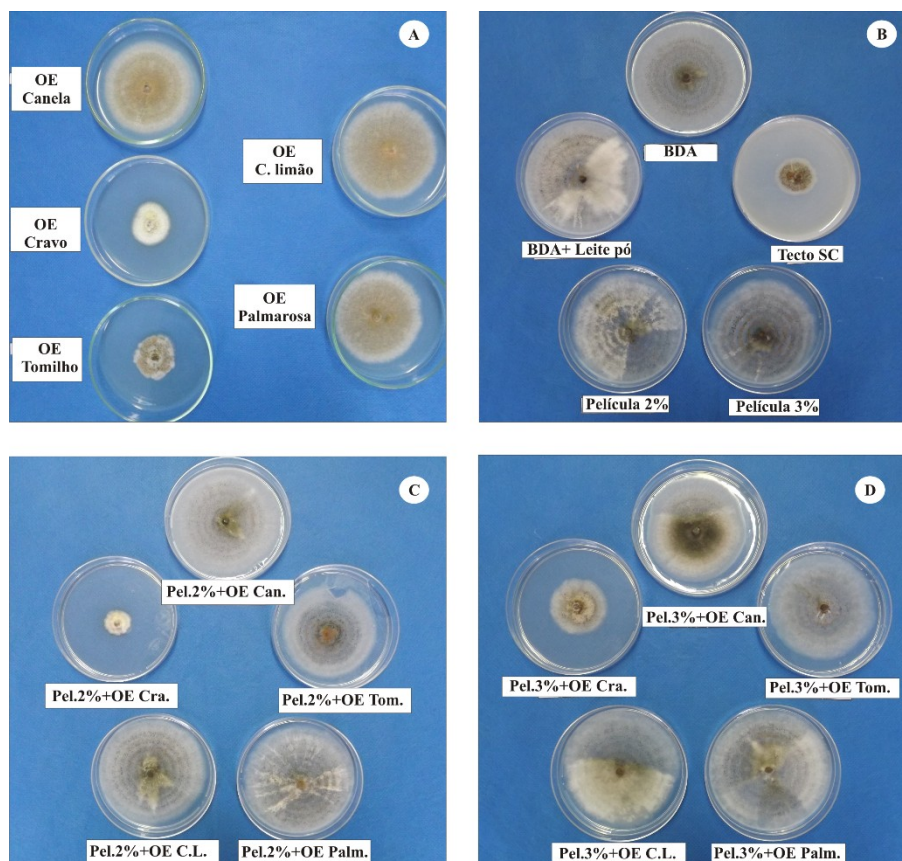


Figura 4 Fotografias das placas de Petri dos respectivos tratamentos no último dia de avaliação do experimento *in vitro* de crescimento micelial

Legenda: A. Tratamentos contendo somente os cinco óleos essenciais (OE); B. Tratamentos contendo BDA, BDA com solução de leite em pó, Fungicida Tecto SC, Película à base de fécula de mandioca 2% e Película à base de fécula de mandioca 3%; C. Tratamentos contendo Película à base de fécula de mandioca 2% (Pel.2%) associada ao óleo essencial de canela (Can.), cravo (Cra.), Tomilho (Tom.), Capim limão (C.L.) e Palmarosa (Palm.); D. Tratamentos contendo Película à base de fécula de mandioca 3% (Pel.3%) associada ao óleo essencial de canela (Can.), cravo (Cra.), Tomilho (Tom.), Capim limão (C.L.) e Palmarosa (Palm.). Cada placa possui tamanho de 9cm.

Na literatura, é possível encontrar trabalhos com resultados similares com relação à germinação de conídios e óleos essenciais em concentrações variadas e utilizando diferentes metodologias, bem como crescimento micelial.

Os resultados deste trabalho, corroboram com os resultados obtidos por alguns autores em outros patossistemas, apresentados a seguir.

Hoyos et al. (2012) verificaram interação significativa entre concentração dos óleos essenciais e porcentagem de germinação de conídios em duas estirpes de *P.griseola*, sendo que a 0,1%, *C. citratus*, *C. martini*, *E. caryophyllata*, *Cinnamomum sp.*, *T. vulgaris*, *M. recutita* e *C. verbenácea* mostraram atividade antifúngica contra as 2 estirpes. Na concentração 0,02%, a germinação de conídios da estirpe 63 foi totalmente inibida por *C. citratus*, *C. martini*, *E. caryophyllata* e *Cinnamomum sp.* No entanto, na estirpe 31, esses 2 últimos óleos não mostraram eficiência. Em todas as concentrações testadas, alguns óleos estimularam a germinação nas duas estirpes, sendo estes *C. nardus* (0,02%), *Z. officinale* (0,02%), *R. officinalis* (0,1%) e *C. limon* (0,1%, 0,02% e 0,5%), o que comprova que nem todo óleo essencial é efetivo na germinação de conídios e inclusive pode estimular, como ocorrido no presente trabalho.

Souza Júnior, Sales e Martins (2009), trabalhando com os óleos essenciais de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.), alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.), capim-santo (*Cymbopogon citratus* Stapf), cidrão (*Lippia citriodora* Kunth.), e goiaba vermelha (*Psidium guayava* var. pomifera L.) verificaram que em concentrações acima de 1 μ L em 1mL de meio ágar-água é capaz de controlar 100% da germinação de conídios de *C. gloeosporioides* isolado do maracujá. Todos os óleos, exceto o de goiaba, inibiram o crescimento micelial em todas as dosagens utilizadas (1, 3, 5 e 10 μ L.mL⁻¹).

Bastos e Albuquerque (2004) verificaram que conídios de *Colletotrichum musae* em suspensão líquida em contato com óleo essencial de *Piper aduncum* sofreram 100% de inibição da germinação, nas concentrações de 100 μ g.mL⁻¹ e 150 μ g.mL⁻¹. Com relação ao crescimento micelial, o óleo em questão reduziu o crescimento micelial a partir da dose de 50 μ g.mL⁻¹.

Aquino et al. (2014) constataram que a germinação dos conídios de *C. gloeosporioides* isolado de maracujá foi reduzida pelo óleo de *C. citratus*, na concentração de 1 e $3\mu\text{L.mL}^{-1}$ e inibindo completamente a germinação a partir da concentração de $3\mu\text{L.mL}^{-1}$. Os outros óleos utilizados, *Lippia sidoides* e *Ocimum gratissimum*, inibiram a germinação a partir da concentração de $5\mu\text{L.mL}^{-1}$. O óleo essencial de *C. citratus* proporcionou a maior inibição do crescimento micelial nas concentrações de 1 e $3\mu\text{L.mL}^{-1}$, diferenciando dos demais óleos testados. A partir dessas concentrações, os óleos de *C. citratus* e *L. sidoides*, foram iguais quanto a esse parâmetro. O óleo de *O. gratissimum* apresentou menor efeito na inibição do crescimento micelial, em todas as concentrações.

Carnelossi et al. (2009) utilizaram os óleos essenciais de capim limão, eucalipto, menta e estragão visando a controlar o crescimento micelial de *C. gloeosporioides* isolado de mamão e concluíram que todos os óleos testados inibiram em 100% o crescimento micelial do fungo na alíquota de $50\mu\text{L}$, que foi a maior utilizada. O óleo de *C. citratus* foi o mais eficiente, pois causou inibição de 100% a partir da alíquota de $10\mu\text{L}$. Foi também avaliada a esporulação nas placas tratadas (número de conídios. cm^2) e o óleo essencial de *C. citratus* foi o mais eficiente, inibindo 100% a esporulação a partir da alíquota de $10\mu\text{L}$. Para os óleos de *E. citriodora* e *M. arvensis*, a partir da alíquota de 15 e $10\mu\text{L}$, respectivamente, começou a se observar redução na esporulação.

Roswalka (2010), trabalhando com antracnose da goiaba e da banana, obteve controle do crescimento micelial, utilizando a fração volátil de óleos essenciais. O crescimento de *C. musae* e *C. gloeosporioides* foi inibido, principalmente pelos óleos essenciais de canela, tomilho e cravo dentre outros, visto que foram utilizadas concentrações maiores do que no presente experimento. A autora também realizou testes de germinação de conídios, porém com diferente metodologia e concentração de conídios mais baixa (3×10^3), e

verificou que o óleo essencial de canela em todas as concentrações utilizadas (0,5; 0,1 e 0,02%) inibiram, completamente, a germinação de conídios.

Barrera-Necha et al. (2008) notou efeito significativo da ação de óleos essenciais sob *C. gloeosporioides* isolado de mamão. O óleo essencial de tomilho inibiu crescimento micelial a partir da dose de $200\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo que metade dessa dosagem não reduziu o crescimento micelial. O crescimento micelial foi reduzido nos tratamentos contendo óleo essencial de cravo e de canela, verificando-se inibição dose dependente, ou seja, com aumento da dose ocorreu redução percentual do crescimento radial. Quanto à germinação, os óleos de cravo e de canela reduziram a germinação em até 98% com relação à testemunha, nas doses de 50 a $250\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizadas. Alguns óleos utilizados não surtiram efeito na redução do crescimento e inibição da germinação, o que corrobora com os resultados obtidos neste trabalho, já que nem todos os óleos foram eficientes.

4.5 Experimento *in vivo*

Os dados atenderam às três suposições da ANAVA, possuem normalidade, independência dos resíduos e homogeneidade da variância. Houve diferença significativa entre os tratamentos conforme o teste de médias utilizado, tanto para a escala diagramática quanto para as medições.

No caso do método de avaliação por medições com paquímetro, o coeficiente de variação foi 13,87% e os melhores resultados foram observados nos frutos tratados com película à base de fécula de mandioca 2% e 3% isoladamente ou em combinação com os óleos essenciais utilizados. (Gráfico 1).

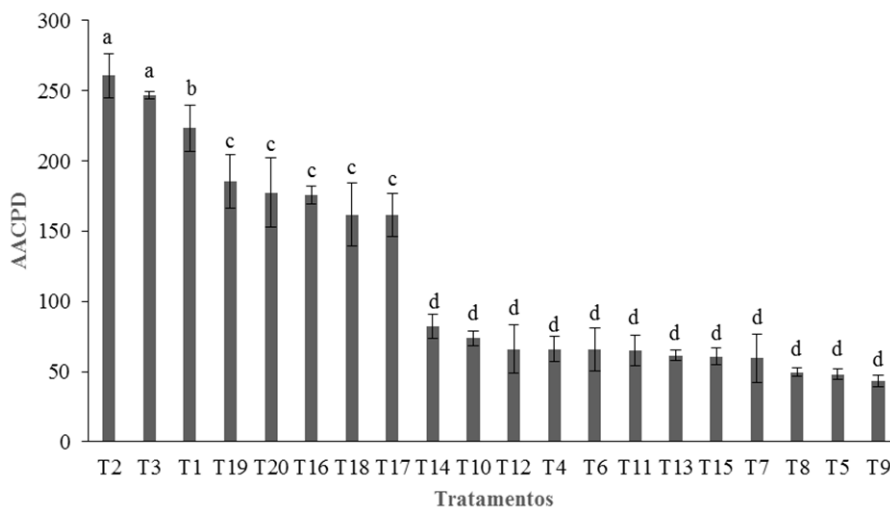


Gráfico 1 Área abaixo da curva de progresso da doença para antracnose em manga ‘Tommy Atkins’ sob diferentes tratamentos avaliados com paquímetro digital

Legenda: T1 fungicida Tecto SC, T2 Água, T3 solução de leite em pó, T4 Película à base de fécula de mandioca 2% (PFM2%), T5 Película à base de fécula de mandioca 3%(PFM3%), T6 PFM2% associada ao óleo essencial de canela, T7 PFM2% associada ao óleo essencial de cravo, T8 PFM2% associada ao óleo essencial de tomilho, T9 PFM2% associada ao óleo essencial de capim limão, T10 PFM2% associada ao óleo essencial de palmarosa, T11 PFM3% associada ao óleo essencial de canela, T12 PFM3% associada ao óleo essencial de cravo, T13 PFM 3% associada ao óleo essencial de tomilho, T14 PFM3% associada ao óleo essencial de capim limão, T15 PFM 3% associada ao óleo essencial de palmarosa, T16 óleo essencial de canela, T17 óleo essencial de cravo, T18 óleo essencial de tomilho, T19 óleo essencial de capim limão, T20 óleo essencial de palmarosa. Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knot à 5% de probabilidade.

Para o método de avaliação, utilizando a escala diagramática de Corkidi et al. (2006), o coeficiente de variação foi calculado em 6,44% e os melhores tratamentos foram os mesmos do método de avaliação anterior (Gráfico 2).

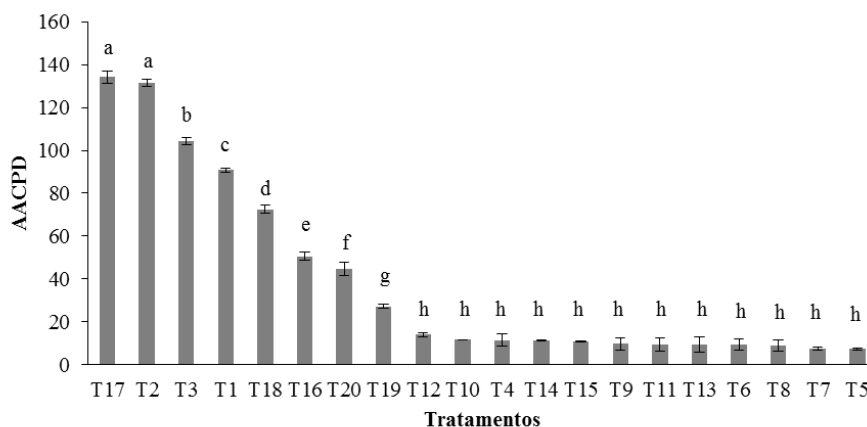


Gráfico 2 Área abaixo da curva de progresso da doença para antracnose em manga ‘Tommy Atkins’ sob diferentes tratamentos avaliados com escala diagramática de Corkidi et al.(2006)

Legenda: T1 fungicida Tecto SC, T2 Água, T3 solução de leite em pó, T4 Película à base de fécula de mandioca 2% (PFM2%), T5 Película à base de fécula de mandioca 3%(PFM3%), T6 PFM2% associada ao óleo essencial de canela, T7 PFM2% associada ao óleo essencial de cravo, T8 PFM2% associada ao óleo essencial de tomilho, T9 PFM2% associada ao óleo essencial de capim limão, T10 PFM2% associada ao óleo essencial de palmarosa, T11 PFM3% associada ao óleo essencial de canela, T12 PFM3% associada ao óleo essencial de cravo, T13 PFM 3% associada ao óleo essencial de tomilho, T14 PFM3% associada ao óleo essencial de capim limão, T15 PFM 3% associada ao óleo essencial de palmarosa, T16 óleo essencial de canela, T17 óleo essencial de cravo, T18 óleo essencial de tomilho, T19 óleo essencial de capim limão, T20 óleo essencial de palmarosa. Colunas seguidas de mesma letra, não diferem entre si, pelo teste Scott-Knot à 5% de probabilidade.

Os dois métodos de avaliação utilizados foram pertinentes e coerentes. De acordo com a correlação de Person, houve 85,14% de similaridade, portanto a escala foi útil para representar os dados. A escala diagramática utilizada leva em conta a intensidade de todas as lesões presentes em cada face avaliada, mesmo as não provenientes de inoculação; já, a aferição com paquímetro leva em conta somente as dimensões da lesão que foi inoculada e, possivelmente, em razão deste fator, a correlação não foi maior, visto que surgiram outras lesões em

diferentes pontos, durante o experimento, provavelmente de inóculo proveniente do pomar.

Foi possível observar, visualmente, o efeito positivo dos tratamentos contendo a película combinada ou não aos óleos essenciais, nos quais as lesões referentes aos pontos de inoculação não tiveram desenvolvimento significativo como no tratamento controle positivo (Figura 5: B, C e D). No último dia de avaliação, no momento da coleta para as amostras de microscopia, após a retirada da lesão no ponto de inoculação, foi possível perceber que os tecidos do epicarpo e mesocarpo não apresentavam nenhum dano visualmente aparente, apresentando coloração normal de polpa, sem manchas enegrecidas provenientes da antracnose (Figura 5: F). Como o experimento realizado em caráter curativo teve bons resultados, possivelmente se o tratamento for executado logo após a colheita em caráter preventivo, o resultado esperado no quesito controle da antracnose poderia ser muito melhor.

A utilização da película também favoreceu visualmente na aparência dos frutos, que permaneceram com brilho e conservação da cor. Também foi possível verificar visualmente alterações com relação à maturação dos frutos, já que, nos tratados com película, a maturação foi aparentemente retardada e uniformizada. (Figura 5). São necessários estudos aprofundados com relação a esses aspectos de qualidade pós-colheita, visando a verificar se há diferenças entre os tratamentos nos quesitos físico-químicos como sólidos solúveis, acidez, firmeza, características sensoriais, dentre outros.

O fungicida em questão não apresentou eficiência no presente trabalho, que pode ser verificado nos gráficos de AACPD e nas imagens (Figura 5: A e B). Isso pode ter ocorrido, porque o fabricante recomenda que os frutos sejam tratados por imersão logo após a colheita, quando os frutos ainda estão menos maduros do que os utilizados no presente experimento, e ainda danificados mecanicamente pelos furos de inoculação. Como referido anteriormente, o

processo de maturação e os danos mecânicos facilitam a penetração e desenvolvimento de patógenos. Por outro lado, na literatura, ocorrem diversos relatos com relação à resistência de estirpes de fungos aos benzimidazóis, o que pode ser uma hipótese para explicar a ineficiência desse fungicida no experimento.



Figura 5 Fotografias dos frutos de manga inoculados e tratados no último dia avaliação do experimento

Legenda: A. Mangas tratadas com Tecto SC, água destilada e solução de leite em pó, respectivamente. B. Mangas tratadas com Tecto SC, película à base de fécula de mandioca 2% (PFM2%) e película à base de fécula de mandioca 3% (PFM3%) respectivamente. C. Mangas tratadas com PFM2% associada ao óleo essencial de canela, PFM2% associada ao óleo essencial de cravo, PFM2% associada ao óleo essencial de tomilho, PFM2% associada ao óleo essencial de capim limão, PFM2% associada ao óleo essencial de palmarosa. D. Mangas tratadas com PFM3% associada ao óleo essencial de canela, PFM3% associada ao óleo essencial de cravo, PFM3% associada ao óleo essencial de tomilho, PFM3% associada ao óleo essencial de capim- limão, PFM3% associada ao óleo essencial de palmarosa. E. Mangas tratadas com óleo essencial de canela, óleo essencial de cravo, óleo essencial de tomilho, óleo essencial de capim limão, óleo essencial de palmarosa. F. Manga tratada com PFM2%, mostrando polpa intacta na retirada da lesão do ponto de inoculação.

Vale ressaltar que, após o término do período de avaliação de 8 dias, foi mantida uma repetição dos melhores tratamentos para verificar a longevidade dos frutos. A maioria dos frutos permaneceram com boa aparência visual e as lesões se mantiveram controladas por mais seis dias após o término do experimento, ou seja, 14 dias após tratamento (Figura 6). Esse dado é de extrema importância no quesito comercialização dos frutos, visto que o mercado exige frutos com alta qualidade e maior durabilidade possível na prateleira.

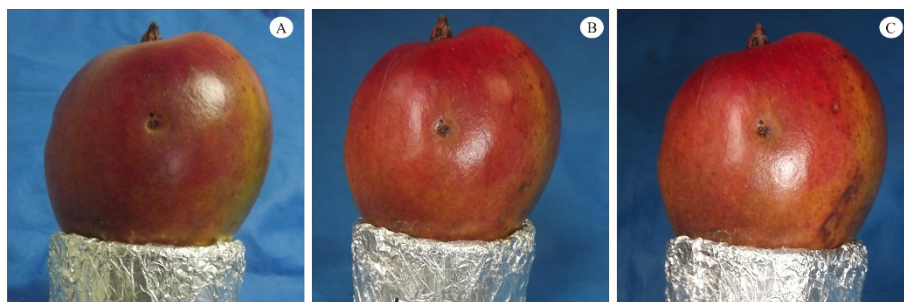


Figura 6 Fotografia da mesma lesão da mesma repetição do tratamento à base de película de fécula de mandioca 3% em datas posteriores à última avaliação do experimento

Legenda: A. Fruto com 10 dias após tratamento B. Fruto com 12 dias após tratamento C. Fruto com 14 dias após tratamento.

Pelas análises das imagens de MEV, foi possível confirmar os resultados obtidos nos dois métodos de avaliação. Nos tratamentos contendo película à base de fécula de mandioca com ou sem óleos essenciais, é possível verificar o efeito positivo na proteção dos frutos, quanto à germinação dos conídios e penetração do fungo, que age como uma barreira protetora à colonização, limitando o desenvolvimento do patógeno, evitando o aumento significativo da lesão no fruto e proliferação da doença. Na figura 7 (A, B e C), verifica-se desenvolvimento normal do patógeno, sendo a imagem A referente ao tratamento com fungicida, evidenciando que este não teve ação esperada no

fungo; as imagens B e C retratam o tratamento com água e com leite em pó, respectivamente, mostrando numerosos conídios, inclusive alguns germinando e continuando o processo de colonização. Na figura 7 (D e E), é possível visualizar germinação dos conídios e crescimento micelial por cima da película, que protege, principalmente o contato direto do fungo com o epicarpo do fruto, retardando o desenvolvimento de lesões. Na figura 7 (F), é possível visualizar a película detalhadamente na superfície do fruto, sua espessura delgada, inclusive a penetração da película nos sulcos do epicarpo do fruto, no tratamento com fécula de mandioca a 2%.

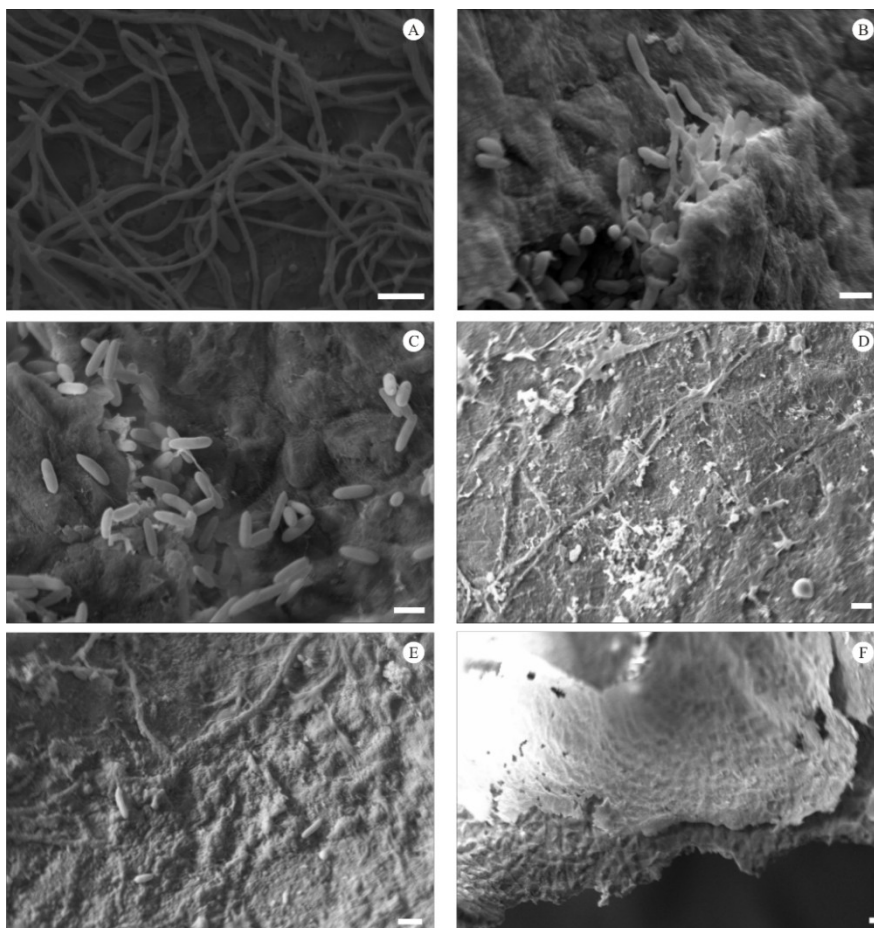


Figura 7 Eletromicrografias de varredura de fragmentos de mangas inoculadas com *Colletotrichum* sp. e seus respectivos tratamentos

Legenda: A. Presença de hifas e conídios germinados em fruto tratado com Tecto SC. B. Conídios germinando em fenda no epicarpo do fruto tratado com água destilada. C. Numerosos conídios em fruto tratado com solução de leite em pó. D. Hifas com crescimento limitado pela fécula de mandioca 2%. E. Presença de conídios não germinados e poucas hifas sobre a película de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de canela. F. Destaque para a espessura da película de fécula de mandioca 2% sobre o epicarpo da manga. As barras correspondem a 10 μ m.

Em alguns tratamentos contendo película combinada aos óleos é possível observar hifas deformadas e colapsadas, provavelmente decorrentes de

alguns compostos fungitóxicos presentes nos óleos (Figura 8: A e C). Na figura 8 (E), evidencia-se o impedimento da película no desenvolvimento fúngico, estando o conídio fortemente envolvido e aderido a ela.

Nas regiões onde não houve boa cobertura da película é possível verificar desenvolvimento das estruturas fúngicas (Figura 8: A e D), o que leva a crer que o recobrimento deve ser o mais uniforme possível para não permitir áreas de escape.

Quanto ao mesocarpo do fruto, por meio da criofratura, visualiza-se que não ocorreu colonização interna dos tecidos nos tratamentos contendo película, o que explica o baixo desenvolvimento das lesões durante o período de avaliação (Figura 8: C). Nos tratamentos contendo somente óleos essenciais, as imagens obtidas mostraram que o desenvolvimento fúngico ocorreu normalmente, portanto os óleos essenciais na concentração utilizada isoladamente não impediram ou retardaram a doença.

Assim como verificado no experimento *in vitro*, nas imagens de microscopia eletrônica do tratamento contendo somente óleo essencial de canela, numerosos conídios foram visualizados, mas dificilmente encontrado um conídio germinado, o que comprova a ação protetora desse óleo (Figura 8: F).

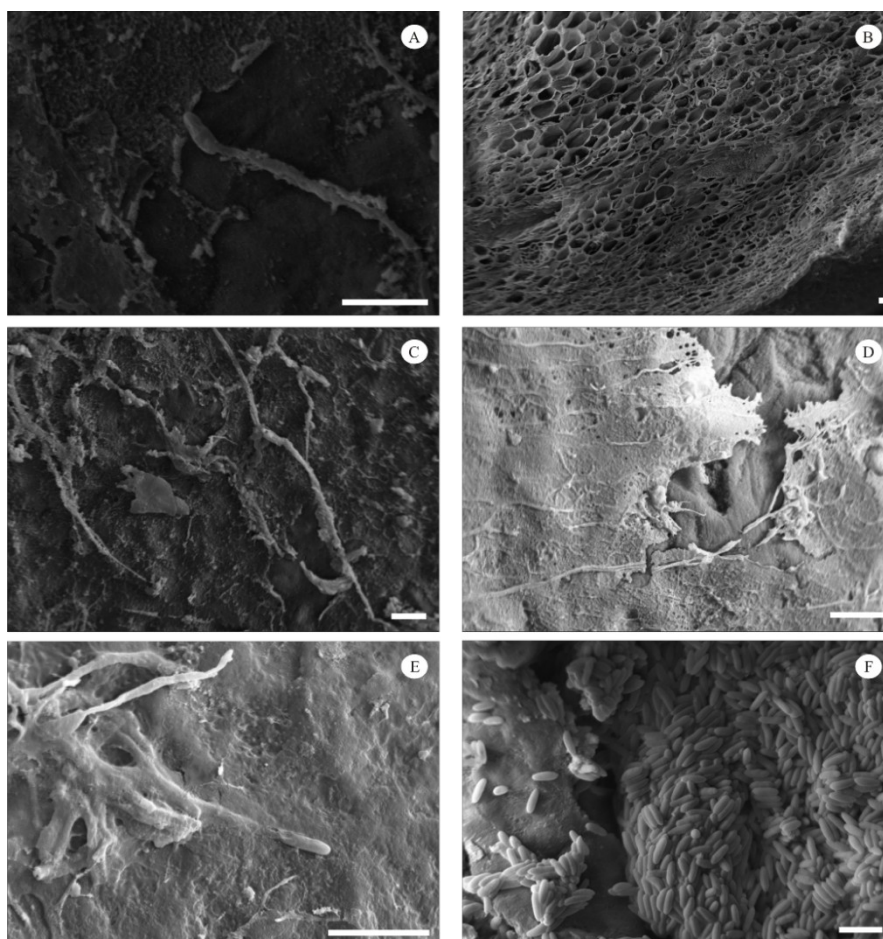


Figura 8 Eletromicrografias de varredura de fragmentos de mangas com seus respectivos tratamentos

Legenda: A. Conídio com aspecto deformado germinado, assim como suas hifas no tratamento contendo película à base de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de tomilho. B. Epicarpo e mesocarpo criofraturados com nitrogênio líquido sem nenhum sinal do fungo. C. Presença de conídio germinado e hifas deformadas e colapsadas no tratamento à base de película de fécula de mandioca 2% associada ao óleo essencial de palmarosa. D. Detalhe para o crescimento fúngico sobre a película que atua como barreira e área central sem recobrimento que permitiu germinação e crescimento sobre o epicarpo do fruto no tratamento contendo película 3% associada ao óleo de capim limão. E. Detalhe para conídio germinado envolvido pela película 3% associada ao óleo essencial de cravo. F. Numerosos conídios não germinados no tratamento contendo óleo essencial de canela. As barras correspondem a 20 μ m.

Como verificado, a película à base de fécula de mandioca apresentou resultado satisfatório em ambas as formulações de 2 ou 3%, associada ou não aos óleos essenciais. Os óleos essenciais podem ser utilizados visando a efeito sinérgico com a película, visto que os óleos podem ficar complexados nela, podendo intensificar o controle contra o patógeno. Na literatura, é possível encontrar diversos trabalhos com relação a revestimento de frutos combinados ou não aos óleos essenciais no controle de patossistemas, com resultados compatíveis aos encontrados neste.

Bosquez-Molina et al. (2010) confirmaram ação antimicrobiana da goma de algaroba à 10% associada ao óleo essencial de tomilho e limão mexicano em mamão. Obtiveram 100% de controle curativo da antracnose nos frutos tratados com a goma associada ao óleo de tomilho 0,1% e o mesmo resultado para a goma combinada a 0,5% do óleo de limão mexicano. Esses revestimentos reduziram a deterioração por micro-organismos. Esses autores relatam que elevadas concentrações de óleos essenciais em tratamento pós- colheita de frutos podem causar fitotoxidez, levando os tecidos do fruto à deterioração precoce e perda das barreiras pré-existentes na resistência, elevando a infecção de fitopatógenos. Esse fator pode explicar o ocorrido no atual trabalho, já que os óleos isolados que tiveram bom desempenho nos experimentos *in vitro*, como o de canela e cravo, não tiveram bom desempenho no experimento *in vivo* sem associação com biopelícula, somente quando associados proporcionaram controle efetivo.

Lima et al. (2012) adicionaram extrato de erva doce 1,5% à película de fécula de mandioca 3% e observaram retardo no processo de maturação de frutos ‘Tommy Atkins’. Observaram também que o extrato de erva doce isoladamente provocou alterações negativas na aparência do fruto.

Oriani et al. (2014), trabalhando com maçãs fatiadas tratadas com película de fécula de mandioca 2 e 3%, verificaram que o óleo essencial de

canela a 0,05% associado à película em ambas as concentrações possuem alta atividade antimicrobiana para bactérias frequentemente encontradas em alimentos minimamente processados, além de sua ação antioxidante por meio através do retardamento do escurecimento das maçãs. Os autores deixam claro que mais estudos devem ser executados nesse âmbito, para verificar se ocorrem alterações nas características sensoriais do produto final.

Serpa et al. (2014) mostraram que também é possível utilizar película de fécula de mandioca preparada com extrato de cravo e de canela na conservação pós-colheita de mangas ‘Palmer’. Os extratos foram preparados colocando-se o material vegetal em água destilada por 12 ou 24 horas e, posteriormente, preparadas as soluções de fécula 3%. Esses tratamentos se mostraram muito eficientes na redução de fitopatógenos naturalmente encontrados nessas frutas, *L. theobromae* e *C. gloeosporioides*, sendo o tratamento com extrato de cravo ainda mais satisfatório.

Maqbool et al. (2011), buscando controle de antracnose pós- colheita em banana e mamão, encontraram resultados satisfatórios, utilizando goma arábica 10% combinada ao óleo essencial de canela 0,4% nos frutos inoculados, bem como nos parâmetros físico-químicos analisados. Nos testes *in vitro*, resultados semelhantes ao presente trabalho foram verificados, já que a goma arábica, isoladamente, não controlou a germinação de conídios nem o crescimento micelial, somente quando combinada aos óleos utilizados, assim como a fécula de mandioca.

Oliveira (2013) obteve 100% de controle de antracnose em mamões tratados com película de fécula de mandioca 3% associada ou não a óleos essenciais, sendo os óleos utilizados pelo autor os mesmos em questão.

Roswalka (2010) avaliou potencial controle preventivo da película à base de fécula de mandioca associada ou não a óleos essenciais no controle da antracnose em goiaba. Diversos resultados coincidem com o do presente

trabalho. Primeiro, a autora demonstrou que nas áreas desuniformes de recobrimento podem favorecer o patógeno, fenômeno este comprovado, neste trabalho, nas imagens anteriores de MEV; atribuiu a descontinuidade do recobrimento às falhas na fase de preparo da película, principalmente na fase de gelatinização em que se temperaturas acima de 90 °C forem atingidas ocorre perda da viscosidade da calda, também na fase de secagem deve haver atenção dobrada. Comprovou a eficácia da película 2% isolada ou combinada aos óleos utilizados, sugerindo que essa eficiência pode estar diretamente ligada à interferência da película sob a maturação dos frutos, por meio do retardo ou modificações enzimáticas que devem ocorrer no processo normal de maturação, o que leva a alterações no desenvolvimento patogênico. As imagens obtidas por meio de MEV pela autora são bem similares às realizadas neste trabalho, evidenciam a película no fruto como uma barreira protetora que é limitante ao desenvolvimento fúngico, mostrando conídios deformados e colapsados sobre a película, o mesmo verificado em hifas, que a autora atribui também aos óleos essenciais.

Com o auxílio da microscopia de epifluorescência foi possível evidenciar e localizar estruturas fúngicas presentes na superfície dos fragmentos dos frutos coletados lesionados. O calcoflúor, como esperado, penetrou na parede celular fúngica e emitiu fluorescência, permitindo visualização e localização de conídios e hifas na superfície dos tecidos infectados de manga (Figura 9: A e B). Gonçalves et al. (2006) concluíram que é possível localizar rapidamente *Penicillium brevicompactum*, bem como outros fungos filamentosos em biofilmes com auxílio do fluorocromo calcofluor white, tanto a massa micelial, quanto somente um filamento de hifa isolado. Hoch et al. (2005), utilizando esse fluorocromo, visualizaram detalhes de estruturas dos fungos *Phytophthora infestans* e *Sclerotinia sclerotiorum*, e da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Esses autores relatam que a visualização paredes das

células fúngicas, septos e apressórios é facilitada pelo uso desse fluorocromo, detalhes estes importantes, em estudos morfológicos e em biologia celular. Roca et al. (2005) também utilizaram esse fluorocromo como importante ferramenta no estudo da biologia celular na anastomose de conídios de *N. crassa*, evidenciando a parede celular dos conídios e diferenciando os tubos germinativos e dos tubos de anastomose conidial que são morfológicamente diferentes dos anteriores.

A rodamina possibilitou visualização precisa dos conídios presentes na superfície dos tecidos e possibilitou também contrastação negativa do núcleo dos conídios em todos os tratamentos (Figura 9: C e D). Na figura 9-C, nota-se uniformidade na fluorescência do conídio proveniente do tratamento com película à base de fécula de mandioca 2%, já na figura 9-D é possível visualizar desuniformidade na fluorescência dos conídios provenientes do tratamento contendo óleo essencial de canela, esse fator pode ter ocorrido, em decorrência dos compostos presentes no óleo essencial de canela, que podem ter alterado algumas estruturas celulares dos conídios. A mesma falta de uniformidade foi verificada nos outros tratamentos contendo óleos essenciais. Hoyos et al. (2012), utilizando microscopia eletrônica de transmissão verificaram alterações ultraestruturais em conídios de *P. griseola*, dentre essas alterações, encontrou desorganização celular, alterações nas membranas e retração do plasmalema em conídios tratados com óleos essenciais de *C. martini*, *C. citratus* e *E. caryophyllata*, hipótese esta que pode explicar a fluorescência sem uniformidade nos conídios provenientes do tecido de manga, tratando com óleos essenciais combinados ou não à película. Segundo Johnson, Walsh e Chen (1980), a rodamina possui afinidade com proteínas, principalmente aquelas presentes nas membranas celulares de fungos e, especialmente nas mitocôndrias, que possuem alto teor proteico, o que explica a fluorescência verificada neste trabalho. Breeuwer e Abee (2000) relatam que esse fluorocromo é amplamente utilizado em tecidos vivos para inferir a taxa respiratória de micro-organismos, por meio

da variação do gradiente eletroquímico nas membranas mitocondriais. Com relação ao não fluorescimento do núcleo, possivelmente esse fluorocromo não penetrou no núcleo, em decorrência da proteção oferecida a essa organela pelo envoltório nuclear. Fica evidente, portanto, que os fluorocromos utilizados são de importante no auxílio nos estudos referentes à interação planta-patógeno, ferramenta importante, neste trabalho, principalmente, pela fácil localização e destaque de estruturas do patógeno inoculado nas mangas.

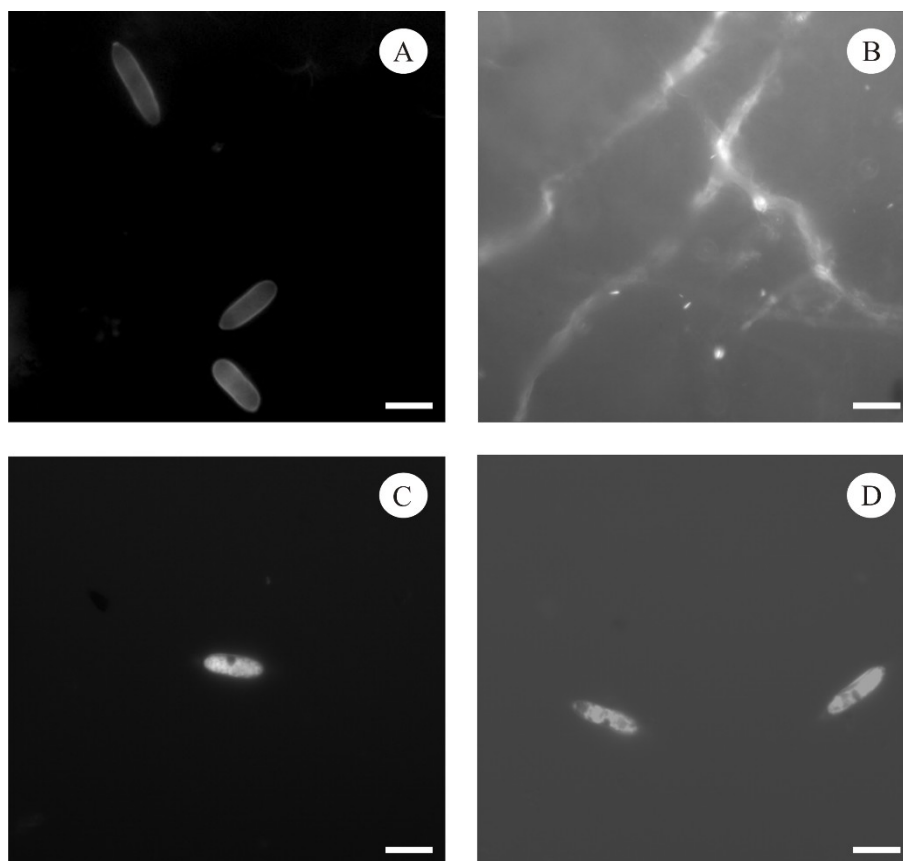


Figura 9 Micrografias de epifluorescência de conídios e micélio na superfície dos tecidos de manga do isolado utilizado evidenciando a fluorescência emitida

Legenda: As partes que fluoresceram nos filtros utilizados estão representadas nas imagens na cor branca. A. Conídios fluorescentes após tratamento com calcofluor White. B. Hifas fluorescentes após tratamento com calcofluor White. C. Conídio fluorescente após contato com rodamina e núcleo sem emissão de fluorescência em tratamento com película à base de fécula de mandioca 2% D. Conídios fluorescentes após contato com rodamina evidenciando núcleo sem emissão de fluorescência em tratamento contendo óleo essencial de canela. As barras correspondem à 10µm.

Ocorrem conflitos *in vitro* e *in vivo* com relação ao controle de fitopatógenos. Como exemplo Bång (2007), constatou que frações voláteis do óleo essencial de *Thymus vulgaris* foi de excelente ação antifúngica *in vitro*,

porém *in vivo* não controlou os quatro fungos testados. Já, o óleo essencial de *Salvia officinalis* controlou dois dos quatro fungos *in vivo*, porém sem sucesso no teste *in vitro*. Resultado também similar ocorrido neste trabalho, no qual os óleos que tiveram bom desempenho no controle *in vitro* de *Colletotrichum*, não foram capazes de controlar a antracnose nos frutos isoladamente, mas, somente quando associados às películas 2 ou 3%. O que mostra que apenas o *scanning in vitro* é insuficiente na escolha dos óleos a serem utilizados, enfatizando a importância de que ambos os experimentos devem ser realizados.

Outro fator relevante é que a película isoladamente não apresentou atividade fungitóxica ou fungistática nos experimentos *in vitro*, mas controlou satisfatoriamente a antracnose nos frutos, provavelmente o bom desempenho *in vivo* pode ser atribuído a alguma propriedade da fécula sobre o fruto e não diretamente sob o fungo, podendo ser considerada um obstáculo ao desenvolvimento fúngico. Já no caso de associação película-óleo essencial, os óleos podem ter executado alguma ação direta no fungo, verificadas nas imagens de MEV obtidas neste trabalho, confirmando a ação sinérgica de óleo e película.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O isolado, no presente estudo, pertence ao complexo *Colletotrichum* e fica agrupado com *C. asianum* na região gênica analisada.

Os dois métodos de avaliação podem ser utilizados para avaliar severidade do ataque de antracnose em manga na pós-colheita, sendo em campo mais prática a utilização de escala diagramática na quantificação da doença.

Mais estudos são necessários visando a verificar se ocorrem alterações nos atributos de qualidade físico-químicos nos frutos, com o uso desses tratamentos, bem como alteração de características sensoriais.

A MEV permitiu constatação de que a película age como barreira no desenvolvimento fúngico, limitando a colonização dos tecidos pelo patógeno. Os óleos essenciais combinados à película promovem alterações ultraestruturais no patógeno, o que pode ser atribuído ao efeito sinérgico da película mais óleo essencial.

A microscopia de epifluorescência mostra a localização de estruturas fúngicas nos tecidos de manga, mostrando fundamental importância desta ferramenta.

A combinação dos experimentos *in vivo* e *in vitro* é fundamental na elucidação de interações planta-patógeno

6 CONCLUSÕES

O óleo essencial de canela reduz a germinação de conídios e pode ser considerado um biofungicida protetor.

O óleo essencial de cravo isolado ou associado à película é eficiente no controle do crescimento micelial, assim como o óleo de tomilho isoladamente.

As películas 2 e 3% isoladas ou associadas aos óleos essenciais podem ser consideradas estratégias eficazes de controle alternativo na pós-colheita da antracnose em mangas, promovendo, inclusive, características desejadas como brilho dos frutos e aumento do tempo de prateleira.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. A.; HAGGAG, W. M. New safe methods for controlling Anthracnose disease of mango (*Mangifera indica* L.) fruits caused by *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.). **Journal of American Science**, Amsterdam, v. 8, n. 8, p. 361-367, May 2010.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Legislação e resolução de amidos**. Brasília: ANVISA, 2015. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78_amidos.htm>. Acesso em: 20 maio 2015.
- AGRIOS, G. N. **Plant pathology**. 5. ed. Amsterdam: Elsevier Academic, 2005. 922 p.
- ALBUQUERQUE, J. A. S. de et al. **O cultivo da mangueira irrigada no semi-árido brasileiro**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 1999. 77 p.
- ALVES, E. **Curso introdutório de microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: Editora da UFLA, 2005. 43 p. 1 Apostila.
- ALVES, E.; LEITE, B.; KITAJIMA, E. W. Ultra-estrutura na era do DNA. In: PASCHOLATI, S. F. et al. **Interação planta-patógeno: fisiologia, bioquímica e biologia molecular: volume 13**. Piracicaba: Editora da FEALQ, 2008. p. 433-466.
- AMORIM, L.; REZENDE, J. A. M.; BERGAMIN FILHO, A. **Manual de fitopatologia: princípios e conceitos**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2011. 704 p.
- ANARUMA, N. D. et al. Control of *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. in yellow passion fruit using *Cymbopogon citratus* essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 66-73, mar. 2010.
- ÁNGEL, D. N. et al. Enfermedades del mango. In: OLIVEIRA, S. M. A. et al. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica. 2006. p. 19-44.
- ANUÁRIO DA AGRICULTURA BRASILEIRA. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: FNP, 2012. 482 p.

AQUINO, C. F. et al. Chemical composition and *in vitro* activity of three essential oils on *Colletotrichum gloeosporioides* from passion fruit. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 2, p. 329-336, jan. 2014.

ARAUZ, L. F. Mango anthracnose: economic impact and current options from integrated management. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 84, n. 6, p. 600-611, Mar. 2000.

AZEREDO, H. M. C. de. Películas comestíveis em frutas conservadas por métodos combinados: potencial de aplicação. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Paraná, v. 21, n. 2, p. 267-278, jul./dez. 2003.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BÂNG, U. Screening of natural plant volatiles to control the potato (*Solanum tuberosum*) pathogens *Helminthosporium solani*, *Fusarium solani*, *Phoma foveata* and *Rhizoctonia solani*. **Potato Research**, Wageningen, v. 50, n. 2, p. 185-203, Apr. 2007.

BARRERA-NECHA, L. et al. Efficacy of essential oils on the conidial germination, growth of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. f. Sacc. and control of postharvest diseases in papaya (*Carica papaya* L.). **Plant Pathology Journal**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 174-178, July/Dec. 2008.

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotrichum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 29, n. 5, p. 555-557, maio 2004.

BENATO, E. A. Controle de doenças pós-colheita em frutas tropicais. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 25, n. 1, p. 90-92, jan. 1999.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças da mangueira (*Mangifera indica*). In: KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas: volume 2**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. p. 459-460.

BIBI, F.; BALOCH, M. K. Postharvest quality and shelf life of mango (*Mangifera indica* L.) fruit as affected by various coatings. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 38, n. 1, p. 499-507, Aug. 2012.

BOSQUEZ-MOLINA, E. et al. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 57, n. 2, p. 132-137, Aug. 2010.

BREEUWER, P.; ABEE, T. Assessment of viability of microorganisms employing fluorescence techniques. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 55, n. 1, p. 193-200, Apr. 2000.

BRITTO, W. S. F. **Análise da viabilidade financeira da agricultura orgânica versus agricultura convencional: o caso da manga no submédio do vale do São Francisco**. Paraná: [s.n.], 2004. Disponível em: <<http://www.facape.br/agronegocio/07/waldenir-manga-organica-convencional-sober-2004-oca498191.pdf>>. Acesso em: 31 out. 2013.

BRUTON, B. N. Mechanical injury and latent infections leading to postharvest decay. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 747-749, June 1994.

CAI, L. et al. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. **Fungal Diversity**, Tailândia, v. 39, n. 1, p. 183-204, Jan. 2009.

CAMPOS, C. A.; GERSCHENSON, L. N.; FLORES, S. K. Development of edible films and coatings with antimicrobial activity. **Food and Bioprocess Technology**, Amsterdam, v. 4, n. 6, p. 849-875, Sept. 2011.

CAMPOS, R. P.; KWIATKOWSKI, A.; CLEMENTE, E. Post-harvest conservation of organic strawberries coated with cassava starch and chitosan. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 58, n. 5, p. 554-560, out. 2011.

CANNON, P. F.; BRIDGE, P. D.; MONTE, E. Linking the past, present, and future of *Colletotrichum* systematics. In: PRUSKY, D.; FREEMAN, S.; DICKMAN, M. B. (Ed.). **Colletotrichum: host specificity, pathology, and host pathogen interaction**. Saint Paul: APS Press, 2000. p. 1-20.

CAPDEVILLE, G. D. et al. Scanning electron microscopy of the interaction between *Cryptococcus magnus* and *Colletotrichum gloeosporioides* on papaya fruit. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 11, p. 1537-1544, nov. 2007.

CARNELOSSI, P. R. et al. Óleos essenciais no controle pós-colheita de *Colletotrichum gloeosporioides* em mamão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 11, n. 4, p. 399-406, abr. 2009.

- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. rev. e ampl. Lavras: Editora da UFPA, 2005. 783 p.
- COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G. P. P. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 344-349, Mar. 2011.
- CORKIDI, G. et al. Assessing mango anthracnose using a new three-dimensional image-analysis technique to quantify lesions on fruit. **Plant Pathology**, Oxford, v. 55, n. 2, p. 250–257, Abr. 2006.
- CROUCH, J. A. et al. Anthracnose disease of switchgrass caused by the novel fungal species *Colletotrichum navitas*. **Mycological Research**, Cambridge, v. 113, n. 12, p. 1411-1421, 2009.
- CRUZ, M. de M. et al. Efeito de óleos essenciais e revestimentos comestíveis sobre podridões pós-colheita em manga, cv. Kent. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 25, n. 2, p. 1-6, abr./jun. 2012.
- CRUZ, M. J. da S. et al. Efeito dos compostos naturais bioativos na conservação pós-colheita de frutos de mangueira cv. Tommy Atkins. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 428-433, mar./abr. 2010.
- DICKMAN, M. B.; ALVAREZ, A. M. Latent infection caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. **Plant Pathology**, Honolulu, v. 67, n. 7, p. 748-750, July 1983.
- EMPACADORAS DE MANGO DE EXPORTACIÓN. **Norma de calidad para mango fresco de exportación**. Japopan: EMEX, 1998. 11 p.
- FERREIRA, D. F. Análises Estatísticas por meio do Sisvar para Windows 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Editora da UFSCAR, 2000. p. 255-258.
- FEYGENBERG, O. et al. Postharvest use of organic coating for maintaining bio-organic avocado and mango quality. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 682, n. 3, p. 1057-1062, June 2005.

FOSTER, B. **Optimizing light microscopy for biological & clinical laboratories**. Kendall: Hunt Publishing Company, 1997. 187 p.

FREEMAN, S.; KATAN, T.; SHABI, E. Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose diseases of various fruits. **Plant Disease**, Saint Paul, v. 82, n. 6, p. 596-605, June 1998.

GONÇALVES, A. B. et al. FISH and Calcofluor staining techniques to detect in situ filamentous fungal biofilms in water. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 23, n. 3, p. 194-198, July 2006.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packaging: technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. In: MATHLOUTHI, M. (Ed.). **Food packaging and preservation**. Amsterdam: Springer, 1994. p. 159-181.

GUILBERT, S. Technology and application of edible protective films. In: MATHLOUTHI, M. (Ed.). **Food packaging and preservation, theory and practice**. New York: Elsevier Applied Science, 1986. p. 371-394.

GUPTA, C. et al. Comparative analysis of the antimicrobial activity of cinnamon oil and cinnamon extract on some food-borne microbes. **African Journal of Microbiology Research**, Nigéria, v. 9, p. 247-251, Sept. 2008.

HICKEY, P. C. et al. Live-cell imaging of filamentous fungi using vital fluorescent dyes and confocal microscopy. **Methods in Microbiology**, Edinburgh, v. 34, n. 1, p. 63-87, Dec. 2005.

HOCH, H. C. et al. Two new fluorescent dyes applicable for visualization of fungal cell walls. **Mycologia**, New York, v. 97, n. 3, p. 580-588, May/June 2005.

HOYOS, J. M. Á. et al. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 36, n. 3, p. 270-284, maio/jun. 2012.

HUA'AN, Y.; SIVASITHAMPARAM, K.; O'BRIEN, P. A. An improved technique for fluorescence staining of Fungal nuclei and septa. **Australasian Plant Pathology**, Austrália, v. 20, n. 3, p. 119-121, Sept. 1991.

HYDE, K. D. et al. *Colletotrichum*: a catalogue of confusion. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 39, n. 117, p. 1-17, Dec. 2009.

- JARVIS, W. R. Latent infections in pre and postharvest environment. **HortScience**, Alexandria, v. 29, n. 7, p. 749-751, July 1994.
- JOHNSON, G. I.; COATES, L. M. Postharvest diseases of mango. **Postharvest News & Information**, Wallingford, v. 4, n. 1, p. 27-31, Jan. 1993.
- JOHNSON, L. V.; WALSH, M. L.; CHEN, L. B. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 77, n. 2, p. 990-994, Feb. 1980.
- JUNQUEIRA, N. T. V. et al. (Ed.). **Manga: tecnologia, produção, pós-colheita, agroindústria e exportação**. Porto Alegre: Cinco Continentes. 2001. 617 p.
- KANGATHARALINGAM, N.; FERGUSON, M. W. A simple and rapid technique for fluorescence staining of fungal nuclei. **Current Microbiology**, New York, v. 10, n. 2, p. 99-104, Mar. 1984.
- KARTAL, S. N. et al. Effect of essential oil compounds and plant extracts on decay and termite resistance of wood. **Holz als Roh und Werkstoff**, Berlin, v. 64, n. 6, p. 455-461, Mar. 2006.
- KAVATI, R. Formação do pomar e tratos culturais. In: JOSE, A. R. S. et al. (Coord.). **Manga: tecnologia de produção e mercado**. Vitória da Conquista: Editora da UESB, 1996. p. 73-94.
- KESTER, J. J.; FENNEMA, O. Edible films and coatings: a review. **Food Technology**, Chicago, v. 40, n. 12, p. 47-59, 1986.
- KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas: volume 2**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. 663 p.
- LIMA, A. B. et al. Conservação pós-colheita de manga 'Tommy Atkins' orgânica sob recobrimentos bio-orgânicos. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 3, p. 704-710, set. 2012.
- LIMA, N. B. et al. Five *Colletotrichum* species are responsible for mango anthracnose in northeastern Brazil. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 61, n. 1, p. 75-88, May 2013.

LINS, S. R.; ABREU, M. S.; ALVES, E. Estudos histopatológicos de *Colletotrichum* spp. em plântulas de cafeeiro. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, n. 6, p. 488-495, nov./dez. 2007.

LOPES, D. B.; MAGALHÃES, E. E.; LARANJEIRA, F. F. Spatial patterns of mango malformation in irrigated areas of the brazilian semi-arid. In: INTERNATIONAL EPIDEMIOLOGY WORKSHOP, 9., 2005, Landernau. **Proceedings...** França: International Society of Plant Pathology, 2005. p. 56.

LOPES, F. A. et al. Desenvolvimento e caracterização de filmes de base celulósica incorporados com aldeído cinâmico. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 33-40, mar. 2014.

LUCAS, G. C. et al. Microscopia: uma importante ferramenta no estudo da interação planta-patógeno. **Revisão Anual de Patologia de Plantas**, Passo Fundo, v. 19, n. 1, p. 337-385, mar. 2011.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aido in selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v. 2, n. 2, p. 176-177, Mar. 1962.

MANICA, I. et al. **Manga: tecnologia, produção, pós-colheita, agroindústria e exportação**. Porto Alegre: Cinco Continentes, 2001. 617 p.

MAQBOOL, M. et al. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 62, n. 1, p. 71-76, Oct. 2011.

MARTINEZ, S. S. **O Nim – Azadirachta indica: natureza, usos múltiplos, produção**. Londrina: Instituto Agrônômico do Paraná, 2002. 142 p.

MATOS, F. J. A. **As plantas da farmácia viva: volume 1**. Fortaleza: Editora Universidade Federal do Ceará, 1997. 57 p.

MENEZES, M. Aspectos biológicos e taxonômicos de espécies do gênero *Colletotrichum*. **Anais da Academia Pernambucana de Ciência Agrônômica**, Recife, v. 3, p. 170-179, 2006.

OLIVEIRA, B. F. de. **Película de amido de mandioca, associada ou não, a óleos essenciais no controle pós-colheita da antracnose em mamão**. 2013. 92

p. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

OLIVEIRA, J. A. **Efeito do tratamento fungicida em sementes no controle de tombamento de plântulas de pepino (*Cucumis sativus* L.) e pimentão (*Capsicum annum* L.)**. 1991. 111 p. Dissertação (Mestrado em Fitossanidade) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1991.

OLIVEIRA, S. M. A. et al. Patologia pós-colheita. In: OLIVEIRA, S. M. A. (Ed.). **Patologia pós-colheita: frutas, olerícolas e ornamentais tropicais**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2006. 855 p.

OPARKA, K. J.; READ, N. D. The use of fluorescent probes for studies on living plant cells. In: HARRIS, N.; OPARKA, K. J. (Ed.). **Plant cell biology: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1994. p. 27-50.

ORIANI, V. B. et al. Properties of cassava starch-based edible coating containing essential oils. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 79, n. 2, p. E189-E194, Feb. 2014.

PADDOCK, S. W. **Confocal microscopy: methods and protocols**. New Jersey: Humana Press, 1999. 1007 p.

PEREIRA, I. S. et al. Estudos histopatológicos da interação *Colletotrichum gloeosporioides* – cafeeiro. **Bragantia**, Campinas, v. 68, n. 1, p. 117-123, jan. 2009.

PEREIRA, I. S. et al. Microscopia eletrônica de varredura da infecção de *Colletotrichum* spp. em frutos de cafeeiros com mancha manteigosa. In: SIMPÓSIO DE PESQUISA DOS CAFÉS DO BRASIL, 4., 2005, Londrina. **Anais...** Londrina: SBI Café, 2005. p. 1-4.

PEREIRA, M. E. C. et al. Amadurecimento de mamão formosa com revestimento comestível à base de fécula de mandioca. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 6, p. 1116-1119, jul. 2006.

PERES, A. P. et al. Perfil enzimático de fungos associados à podridão peduncular do mamão. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 24, n. 1, p. 295-299, jan. 2000.

PERES, N. A. R. et al. Identification and characterization of *Colletotrichum* spp. affecting fruit after harvest in Brazil. **Journal of Phytopathology**, Berlin, v. 150, n. 3, p. 128-134, Mar. 2002.

PERFECT, S E. et al. *Colletotrichum*: a model genus for studies on pathology and fungal–plant interactions. **Fungal Genetics and Biology**, Orlando, v. 27, n. 2, p. 186-198, July 1999.

PERINA, F. **Controle de *Erysiphe diffusa* com óleos essenciais e leite**: estudos ultraestrutural e do modo de ação. 2011. 100 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

PHOULIVONG, S. et al. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 44, n. 1, p. 33–43, Aug. 2010.

PIMENTEL, C. V. de B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. **Alimentos funcionais**: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Varela, 2005. 95 p.

PIZZA JÚNIOR, C. de T.; RIBEIRO, I. J. A. Principais moléstias da mangueira. In: JOSE, A. R. S. **Manga**: tecnologia de produção e mercado. Vitória da Conquista: Editora da UESB, 1996. p. 125-148.

PRIHASTUTI, H. et al. Characterization of *Colletotrichum* species associated with coffee berries in northern Thailand. **Fungal Diversity**, Netherlands, v. 39, n. 1, p. 89-109, Jan. 2009.

PRUSKY, D. Pathogen quiescence in postharvest diseases. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 34, n. 1, p. 413-434, Sept. 1996.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R**: a language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2010.

RESENDE, J. A. M.; MARTINS, M. C. Doenças do mamoeiro. In: KIMATTI, H. et al. **Manual de fitopatologia**: volume 2. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. Cap. 49, p. 440-444.

RIBEIRO, T. P. et al. Uso de revestimentos à base de dextrina na conservação pós-colheita de manga 'Tommy Atkins'. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 31, n. 2, p. 343-351, fev. 2009.

ROCA, M. G. et al. Cell biology of conidial anastomosis tubes in *Neurospora crassa*. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 4, n. 5, p. 911-919, May 2005.

ROCA, M. G. et al. Conidial anastomoses tubes in *Colletotrichum*. **Fungal Genetics and Biology**, San Diego, v. 40, n. 2, p. 138-145, Nov. 2003.

RODRIGUES, E. et al. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de gengibre e eucalipto *in vitro* e em fibras de bananeira infectadas com *Helminthosporium* sp. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 28, n. 1, p. 123-127, jan./mar. 2006.

ROSWALKA, L. C. **Óleos essenciais: ação sobre *Colletotrichum gloeosporioides* e *Colletotrichum musae***, associados ou não à película de fécula de mandioca no controle da antracnose em goiaba. 2010. 198 p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ROSWALKA, L. C.; MIO, L. L. M. de; NAKASHIMA, T. Extratos, decoctos e óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas na inibição de *Glomerella cingulata* e *Colletotrichum gloeosporioides* de frutos de goiaba. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 301-307, mar./abr. 2008.

SANTOS, A. E. O. dos; BATISTA, P. F.; GRAVINA, G. D. A. Influência de biofilmes de fécula de mandioca e amido de milho na qualidade pós-colheita de mangas ‘Tommy Atkins’. **Revista Brasileira de Ciências Agrárias**, Recife, v. 6, n. 3, p. 508-513, jul./set. 2011.

SAUCEDO-VELOZ, C.; TORRES, F. E.; LAKSHMINARAYANA, S. Effect of refrigerated temperatures on the incidence of chilling injury and ripening quality of mango fruit. **Proceedings of the Florida State Horticultural Society**, Tallahassee, v. 90, n. 1, p. 205-210, jan. 1977.

SCANAVACA JUNIOR, L.; FONSECA, N.; PEREIRA, M. E. C. Uso de fécula de mandioca na pós-colheita de manga ‘Surpresa’. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Cruz das Almas, v. 29, n. 1, p. 67-71, fev. 2007.

SERPA, M. F. P. et al. Conservação de manga com uso de fécula de mandioca preparada com extrato de cravo e canela. **Revista Ceres**, Viçosa, v. 61, n. 6, p. 975-982, nov./dez. 2014.

SERRA, I. M. R. S et al. Diversidade fenotípica e patogênica de *Colletotrichum*, agente causal de antracnose em mangueira, e identificação de espécie. **Summa Phytopathologica**, Jaguariúna, v. 37, n. 1, p. 42-51, jan. 2011.

SHANER, G.; FINNEY, R. E. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow mildewing resistance in Knox wheat. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 67, n. 8, p. 1051-1056, Aug. 1977.

SILVA JÚNIOR, A. A.; VIZZOTTO, V. J. Plantas medicinais, aromáticas e fitoprotetoras. **Agropecuária Catarinense**, Florianópolis, v. 9, n. 1, p. 5-8, jan. 1996.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007. 1102 p.

SISTEMA DE AGROTÓXICOS FITOSSANITÁRIOS. **Base de dados de produtos agrotóxicos e fitossanitários**. Brasília: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 2013. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 14 mar. 2014.

SOARES, M. A. **Genes determinantes de patogenicidade e virulência e análise parcial do genoma mitocondrial de *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal da antracnose do feijoeiro comum**. 2007. 210 p. (Tese em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2007.

SOUZA JÚNIOR, I. T.; SALES, N. L. P.; MARTINS, E. R. Efeito fungitóxico de óleos essenciais sobre *Colletotrichum gloeosporioides*, isolado do maracujazeiro amarelo. **Biotemas**, Florianópolis, v. 22, n. 3, p. 77-83, set. 2009.

STANGARLIN, J. R. et al. Plantas medicinais e controle alternativo de fitopatógenos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, v. 11, n. 3, p. 16-21, set. 1999.

SUTTON, B. C. The genus *Glomerella* and anamorph. In: BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. (Ed.). ***Colletotrichum*: biology, pathology and control**. Wallingford: CAB International, 1992. p. 1-26.

SWIFT, S. R. et al. Interactions between azoxystrobin and *Puccinia recondita*, *Erysiphe graminis*, and *Botrytis cinerea* on the microscale. **Scanning**, Mahwah, v. 23, n. 1, p. 153-154, Jan. 2001.

TAVARES, G. M.; SOUZA, P. E. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 29, n. 1, p. 52-59, jan./fev. 2005.

TEMPLETON, M. D. et al. Cloning and molecular characterization of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-encoding gene and cDNA from the plant pathogenic fungus *Glomerella cingulata*. **Gene**, Amsterdam, v. 122, n. 1, p. 225-230, Dec. 1992.

THE STATE OF FOOD AND AGRICULTURE. **The state of food and agriculture 2012: investing in agriculture for a better future**. Rome: FAO, 2012.

VERMA, O.; SINNG, R. Epidemiology of mango die-back caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat. **Indian Journal of the Agricultural Science**, Rajasthan, v. 40, n. 1, p. 813-818, Mar. 1970.

WANG, B. et al. Reduced chilling injury in mango fruit by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and the antioxidant response. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 48, n. 2, p. 172-181, May 2008.

WEIR, B. S.; JOHNSTON, P. R.; DAMM, U. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. **Studies in Mycology**, Netherlands, v. 73, n. 1, p. 115-180, Sept. 2012.

WISNIEWSKI, M. et al. Non chemical approaches to postharvest disease control. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 553, n. 533, p. 407-412, 2001.

ZAHARAH, S. S. et al. Role of brassinosteroids, ethylene, abscisic acid, and indole-3-acetic acid in mango fruit ripening. **Journal of Plant Growth Regulation**, New York, v. 31, n. 3, p. 363-372, Sept. 2012.

ZHU, X. et al. Effects of chitosan coating on postharvest quality of mango fruit. **Journal of Food Processing and Preservation**, Westport, v. 32, n. 5, p. 770-784, Oct. 2008.

ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. A. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing**. New York: Springer, 2009. 400 p.